

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra Farmakologie a toxikologie

Název diplomové práce:

**VZÁJEMNÁ ZÁVISLOST ZÁKLADNÍCH**  
**BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ U PACIENTŮ**  
**S DIABETES MELLITUS 2.TYPU**

Interrelationship of basic biochemical parameters  
in patients of type II diabetes mellitus

Vedoucí katedry: Prof. MUDr. Zdeněk Fendrich, CSc.

Pověřený vedoucí diplomové práce: Mgr. Přemysl Mladěnka

Vypracovala: Bc. Monika Mazurová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli s touto diplomovou prací. Mé poděkování patří především Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za věcné připomínky a odborné vedení celé práce.

## Obsah

I. ÚVOD .....	3
II. TEORETICKÁ ČÁST .....	4
1. DEFINICE .....	4
2. PREVALENCE A INCIDENCE .....	4
3. ROZDĚLENÍ DIABETU .....	5
4. DIABETES MELLITUS 1. TYPU .....	6
4.1. PODTYPY DIABETU 1. typu .....	7
4.1.1. autoimunně podmíněný .....	7
4.1.2. idiopatický DM 1. typu .....	7
4.2. KLINICKÉ PROJEVY .....	8
4.3. KOMPLIKACE .....	8
4.4. LÉČBA .....	9
4.4.1. Nežádoucí účinky inzulínoterapie .....	9
5. DIABETES MELLITUS 2. TYPU .....	10
5.1. ETIOLOGIE .....	10
5.1.1. Porucha sekrece inzulínu .....	10
5.1.2. Inzulínová rezistence (IR): .....	11
5.2. MODY .....	12
5.3. KLINICKÉ PROJEVY .....	13
5.4. KOMPLIKACE .....	13
5.4.1. Akutní komplikace diabetu .....	14
5.4.2. Chronické komplikace .....	16
5.4.3. Nespecifické komplikace .....	17
5.5. LÉČBA .....	17
5.5.1. Nefarmakologická léčba .....	19
5.5.2. Farmakologická léčba .....	19
6. GESTAČNÍ DIABETES MELLITUS .....	20
7. DIABETES MELLITUS JAKO SOUČÁST JINÝCH ONEMOCNĚNÍ ČI STAVŮ (SEKUNDÁRNÍ DIABETES) .....	21
8. LABORATORNÍ METODY U DM .....	21
8.1. GLUKÓZA .....	23
8.1.1. Glykémie nalačno - (FPG, Fasting Plasma Glucose) .....	26
8.1.2. Glykémie po jídle (postprandiální glykémie, PPG) .....	27
8.2. ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST (oGTT) .....	28
8.3. INTRAVENÓZNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST .....	30
8.4. GLYKOVANÝ HEMOGLOBIN (GHb) .....	31
8.5. FRUKTÓZAMIN .....	34
8.6. GLYKOSURIE = glukóza v moči .....	35
8.7. KETONURIE = ketolátky v moči .....	37
8.8. ALBUMIN V MOČI .....	39
8.9. AUTOPROTILÁTKY .....	41
8.10. INZULÍN, C-PEPTID .....	42
III. CÍL PRÁCE .....	44
IV. PRAKTICKÁ ČÁST .....	45
1. MATERIÁL A METODA .....	45
1.1. Materiál .....	45
1.2. Přístroj .....	45
1.3. Pacienti .....	45

1.4. Statistická analýza .....	45
2. VÝSLEDKY .....	46
2.1. Vzájemné závislosti základních biochemických ukazatelů .....	46
2.2. Korelace GHb a glukózy v séru podle časového rozmezí .....	51
2.3. Korelace u glykemií nad 7 mmol/l .....	53
2.4. Korelace glukózy v moči .....	55
3. DISKUSE .....	57
V. ZÁVĚR .....	59
ABSTRAKT .....	60
ABSTRACT .....	61
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	62
LITERÁRNÍ ODKAZY .....	64

# I. ÚVOD

Diabetes mellitus 2. typu je závažné civilizační onemocnění a počty pacientů s tímto typem diabetu stále narůstají. Již v současnosti představuje toto onemocnění významnou socioekonomickou zátěž pro společnost. Z tohoto pohledu bychom se měli věnovat nejen prevenci a včasné diagnóze, ale také správnosti, účelnosti a nezbytnosti laboratorních vyšetření.

## II. TEORETICKÁ ČÁST

### 1. DEFINICE

Diabetes mellitus (DM) je chronická metabolická porucha projevující se hyperglykemií v důsledku absolutního (typ 1) či relativního (charakteristické pro typ 2) nedostatku inzulínu. Je to onemocnění nevyléčitelné, ale vhodnou životosprávou a medikací je možné dlouhodobě tlumit jeho projevy a následky.(65)

### 2. PREVALENCE A INCIDENCE

Počet registrovaných diabetiků každoročně vzrůstá. Více než 90 % diabetiků jsou diabetici 2. typu (Tab.1). Prevalenci diabetu 2. typu výrazně pozitivně ovlivňuje vyšší věk a zvyšující se prevalence obezity.

Podobně jako počty diabetiků, vzrůstají také počty diabetických komplikací a náklady na léčbu těchto pacientů. Jen Všeobecná zdravotní pojišťovna vyplatila za léčivé přípravky, výkony a zdravotnické prostředky v diabetologii v minulém roce 2,5 miliardy korun.(66)

V průběhu roku 2007 zemřelo 22,9 tis. osob s diabetickým onemocněním. Diabetes jako příčina úmrtí byl uveden ve 2 430 případech, jednalo se o osoby ve věku od 20 let. (65) Bližší charakteristika diabetiků, včetně komplikací je zobrazena v Tab.2.

Onemocnění	Primární diabetes				Sekundární diabetes		Porucha glukózové tolerance
	1. typu		2. typu				
	počet	%	počet	%	počet	%	počet
Muži	25 760	7,4	317 922	91,0	5 545	1,6	22 344
Ženy	27 053	6,7	374 152	92,2	4 529	1,1	27 682
Celkem	52 813	7,0	692 074	91,7	10 074	1,3	50 026

Tab. 1. Počet diabetiků v roce 2007 podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky v ČR (ÚZIS, 65)

Počty ošetření - vyšetření a počty léčených pacientů		2003	2004	2005	2006	2007
Počet ošetření - vyšetření	celkem	1 996 484	2 092 856	2 150 656	2 163 419	2 132 384
	na 1000 obyvatel	196	205	210	211	207
	na 1 úvazek lékaře	6 853	6 764	6 853	6 811	6 594
	na 1 léčeného pacienta	3	3	3	3	3
Počet léč. pacientů na 1000 obyv.		67	70	72	73	73
Počet léč. pacientů na 1 úvazek lékaře		2 358	2 301	2 355	2 356	2 335
Počet léčených pacientů celkem k 31. 12.		686 865	712 079	739 305	748 528	754 961
v tom	jen dietou	241 094	242 668	244 703	240 544	223 738
	PAD	297 456	310 659	326 584	332 387	342 947
	inzulínem	105 279	111 937	116 028	120 491	126 035
	inzulínem + PAD	43 036	46 815	51 990	55 106	62 241
Počet nově zjištěných onemocnění		56 683	54 303	56 545	56 311	56 398
Počet úmrtí za období		24 603	23 725	23 326	23 521	22 869

Komplikace diabetu		2003	2004	2005	2006	2007
Diabetická nefropatie		59 811	63 067	66 522	69 842	73 957
z toho	s renální insuficiencí	18 372	19 265	20 864	21 960	24 196
Diabetická retinopatie - celkem		81 085	84 077	85 294	86 527	88 315
z toho	proliferativní	17 206	18 644	19 055	20 339	20 902
	slepota	2 263	2 364	2 447	2 429	2 335
Diabetická noha - celkem		37 971	39 753	40 402	41 328	42 337
z toho	s amputací	7 029	7 444	7 859	7 834	7 853
Počet léčených osob s komplikací diabetu		178 867	186 897	192 218	197 697	204 609

Tab. 2. Charakteristika diabetiků a jejich komplikací (nerozděleno podle typu diabetu) podle ÚZIS (65)

PAD – perorální antidiabetika

### 3. ROZDĚLENÍ DIABETU

Klasifikace podle Světové zdravotnické organizace (WHO) z r. 1985 se ukázala být z více důvodů nedostatečnou. Za hlavní problém se pokládalo rozdělování nejčastějších dvou typů diabetu na inzulin-dependentní a non-inzulin-dependentní diabetes, což vychází z potřeb léčby pacienta, ale nevyjadřuje dostatečně různorodou etiopatogenezu jednotlivých typů diabetu. Z těchto důvodů r. 1997 výbor expertů pro diagnostiku



a klasifikaci diabetes mellitus Americké diabetologické společnosti (ADA) podal návrh nové klasifikace DM. Ta byla s jistými úpravami přijata, nejprve Americkou diabetologickou společností a následně i Mezinárodní federací pro diabetes (IDF). K této klasifikaci se přihlásila i Česká diabetologická společnost (ČDS), a proto se používá rovněž v České republice. (Tab.3)

I. Diabetes mellitus 1. typu
- autoimunně podmíněný
- idiopatický
II. Diabetes mellitus 2. typu
III. Jiné specifické typy diabetes mellitus
IV. Gestační diabetes mellitus

Tab.3. Klasifikace diabetes mellitus podle etiologie, převzato z Martinka, 1999 (32)

Tato klasifikace DM podle etiologie rozlišuje 4 druhy DM, které označuje římskými číslicemi (I.-IV.) a vychází z jejich etiologické různorodosti. Samotné typy diabetu jsou již označeny číslicemi arabskými (1. a 2. = změna oproti klasifikaci dle WHO). (51)

## 4. DIABETES MELLITUS 1. TYPU

Diabetes 1. typu představuje jedno z nejzávažnějších a nejčastějších chronických onemocnění diagnostikovaných v dětském věku. Onemocnění vzniká jako důsledek destrukce  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu autoimunním procesem. Riziko rozvoje onemocnění je vyšší u mladých lidí (zejména u dětí), než u populace starší. (51)

Při rozvoji onemocnění se uplatňuje kombinace genetických faktorů a vnějších vlivů:

- Genetické faktory: zvláště geny HLA (Human Leukocyte Antigen) II. třídy (DR3/DR4, DQ2/DQ8), dále gen inzulinu a řada dalších. Nositelé HLA-DR3 nebo DR4 alely mají 5-8x vyšší riziko rozvoje autoimunitního diabetu. Heterozygoti HLA-DR3/4 mají dokonce 20-40x vyšší riziko.

- Vnější faktory: viry (Coxsackie B, rubeolla, cytomegalovirus), kravské mléko, nedostatek zinku, toxiny, léky a chemikálie, fyzický a psychický stres atd. (8,33)

Příbuzní diabetiků 1. typu mají několikanásobně vyšší riziko vzniku tohoto onemocnění než běžná populace. (14)

## 4.1. PODTYPY DIABETU 1. typu

### *4.1.1. autoimunně podmíněný*

Genetická predispozice kombinovaná s vnějšími faktory může navodit prediabetickou fází onemocnění, která trvá i několik let. V této době dochází k pomalé destrukci  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků zprostředkované aktivovanými T-lymfocyty a cytokiny, která se projevuje jako inzulitis (lymfocytová infiltrace ostrůvkových buněk, zánět). Inzulitis postupně snižuje počet funkčních  $\beta$ -buněk, a způsobuje tak poruchy syntézy a sekrece inzulínu. (33) Autoprotilátky samy pravděpodobně nemají destrukční účinek a jejich přesná úloha v patogenezi autoimunního diabetu 1. typu zatím zůstává nejasná. (15)

Zatímco nezbytnou podmínkou k manifestaci diabetu 1. typu v dětství je destrukce 70-80 % buněk ostrůvků pankreatu, ke klinické manifestaci diabetu 1. typu u dospělých stačí destrukce podstatně menšího počtu  $\beta$ -buněk. Se zvyšujícím se věkem se zvyšuje i inzulínová rezistence, takže srovnatelná hladina volného plazmatického inzulínu vyvolává u dospělých menší metabolický efekt než u dětí. (56)

Pomalu progredující forma inzulitidy trvá léta či desetiletí a vede obvykle k manifestaci diabetu až v dospělosti. Tento typ cukrovky bývá také označován jako **LADA** (latent autoimmune diabetes in adults). Neprojevuje se typickými příznaky DM 1. typu, nemá sklon ke ketoacidóze a bývá často zaměněn za DM 2. typu. (33)

### *4.1.2. idiopatický DM 1. typu*

Na rozdíl od autoimunního DM jsou hodnoty markerů autoimunní inzulitidy – protilátky proti Langerhansovým ostrůvkům (ICA), protilátky proti glutamátdekarboxyláze (GADA), protilátky proti tyrozinofosfatáze (IA2), protilátky proti inzulínu (IAA) v krvi pacienta po celou dobu průběhu onemocnění nízké, až nulové (nemá autoimunní podklad) a také nevykazuje žádnou vazbu s alelami HLA.

Pro europoidní populaci je velmi vzácný, postihuje zejména etnikum africké a asijské a u našich pacientů se s ním téměř nesetkáváme. (51)

K lepšímu odlišení obou podtypů diabetu 1. typu je autoimunní diabetes někdy nazýván Diabetes mellitus typ 1A a idiopatický Diabetes mellitus typ 1B.

## 4.2. KLINICKÉ PROJEVY

Pro DM 1. typu jsou charakteristické následující klinické projevy:

- **Polydipsie.** Ta je způsobena hyperglykémii, která zvyšuje extracelulární osmolaritu. Výsledkem je zvýšené uvolňování vody z buněk (intracelulární dehydratace) a stimulace centra žízně v hypotalamu.
- **Polyurie.** Hyperglykémie vede k osmotické diuréze. Při překročení renálního prahu pro reabsorpci glukózy v proximálním tubulu, zůstává glukóza v močových cestách, kde svým osmotickým efektem vede k sekreci vody a tím zvýšenému množství finální moči.
- **Polyfagie.** Deplece buněčných zásob cukrů, tuků a proteinů vedou ke zvýšení pocitu hladu.
- **Hubnutí.** Z důvodu využívání zásobní tukové tkáně a proteinů jako zdroje energie, event. také z důvodu dehydratace pokud pacient není schopen nahradit ztráty vody při polyurii.
- **Únava** z nedostatku intracelulární glukózy jako zdroje energie. (30)

Manifestace DM1 bývá rychlá, zvláště u dětí jsou to hodiny až dny, u dospělých většinou několik týdnů. (8)

## 4.3. KOMPLIKACE

Rozlišujeme komplikace akutní a chronické. Detailněji jsou tyto komplikace popsány v kapitole č. 5.4. (komplikace DM 2. typu).

Mezi typické akutní komplikace provázející diabetes 1. typu patří diabetická ketoacidóza, která může vyústit až v hyperglykemickou koma. Z chronických komplikací se nejvíce uplatňuje mikroangiopatie, zj. retinopatie (rozvíjí se u 90 % nemocných s DM1), neuropatie a poškození ledvin. (8,39)

## 4.4. LÉČBA

Pro oba podtypy – jak 1A, tak 1B – je typická absolutní a doživotní závislost pacienta na exogenně aplikovaném inzulínu (s výjimkou pacientů po úspěšné transplantaci pankreatu). Jedinou správnou léčbou (ať už se onemocnění manifestuje v dětství či v dospělosti) je proto od počátku léčba inzulínem - inzulinoterapie. Inzulinoterapie může zpomalit destrukci  $\beta$ -buněk a prodloužit období, kdy je alespoň částečně zachovalá vlastní sekrece inzulínu, která spolu s dobrou kompenzací diabetu (udržením normoglykémie) oddaluje rozvoj chronických komplikací diabetu. Časné zahájení léčby inzulínem může přispět k pozdějšímu metabolicky stabilnějšímu průběhu onemocnění. U dětí je někdy dokonce pozorována přechodná (obvykle několik měsíců trvající) obnova sekrece inzulínu (tzv. honeymoon period), která vyžaduje snížení dávek inzulínu na minimum.

Oproti tomu terapie perorálními antidiabetiky typu inzulinových sekretagog (= deriváty sulfonylurey, glinidy) u pacientů mylně klasifikovaných jako DM 2. typu může svým stimulačním vlivem na  $\beta$ -buňku urychlit její autoimunní destrukci. (9)

Nedílnou součástí léčby je dieta a pohybová aktivita. (51,59)

### *4.4.1. Nežádoucí účinky inzulinoterapie*

Nejzávažnější komplikací léčby inzulínem je hypoglykémie, která může vyústit až hypoglykemické koma. Hypoglykémie je lékařský termín vztahující se k patologickému stavu, který je vyvolán nízkou hladinou krevního cukru (pod 3,5 mmol/l).

Manifestace hypoglykémie je velmi rychlá – v průběhu minut. Jejím hlavním nebezpečím je nedostatečné energetické zásobení mozku ("neuroglykopenie") s následkem smrti. (33)

Nejvíce jsou ohroženi diabetici 1. typu v souvislosti s léčbou inzulínem, ale také diabetici 2. typu léčení perorálními antidiabetiky (sulfonylureou) nebo inzulínem. (33)

Hypoglykémie je nejčastěji navozená nižším příjmem potravy než odpovídá aplikované dávce inzulínu nebo PAD. Pokles glykémie může být také důsledkem těžké fyzické námahy, abúzu alkoholu (zejména při hladovění) nebo interakce s léky snižujícími hladinu glukózy v krvi. (39)

Jestliže máme diferenciálně-diagnostické rozpaky, nesmíme v žádném případě ani zkusmo aplikovat inzulín. Pro pacienta s hypoglykemií by mohla být aplikace fatální.

## 5. DIABETES MELLITUS 2. TYPU

Diabetes mellitus 2. typu nahrazuje dřívější termín non-inzulín dependentní diabetes mellitus. Jedná se převážně o onemocnění středního a vyššího věku. 60-90% diabetiků tohoto typu trpí obezitou. Jak bylo uvedeno výše, tento typ cukrovky v naší populaci převládá.(63)

### 5.1. ETIOLOGIE

Etiologie se od diabetu 1. typu značně liší. Je zde vždy vyjádřena v různém poměru se vyskytující inzulínová rezistence (porucha citlivosti periferních tkání k účinku inzulínu) a porucha sekrece inzulínu  $\beta$ -buňkou. Obě poruchy mají genetický podklad a plně se rozvinou pod vlivem určitých nepříznivých vnějších faktorů.(8,51,59)

Při rozvoji onemocnění se uplatňuje řada faktorů, přičemž za rozhodující můžeme považovat vrozenou predispozici (polygenní typ dědičnosti) (30), věk a nadváhu (obézní mají až 10x vyšší riziko než neobézní). Dále se uplatňuje malá fyzická aktivita, stres, kouření, a další faktory. (8) Zhoršení metabolismu glukózy mohou způsobit také některá léčiva (glukokortikoidy, diazoxid,  $\beta$ -blokátory nebo thiazidy).

#### *5.1.1. Porucha sekrece inzulínu*

Někteří autoři považují poruchu sekrece inzulínu  $\beta$ -buňkou při vzniku DM 2. typu za dominantní. (50) V ostrůvcích diabetiků 2. typu dochází k určitým morfologickým změnám, zvláště k akumulaci amyloidu. Ten se nachází i v ostrůvcích nediabetiků staršího věku, ale u diabetiků 2. typu je přítomen v daleko větší míře.

Spolu s inzulínem je ze sekrečních granulí uvolňován amylin, což je hormonálně aktivní peptid, který pravděpodobně tlumí sekreci inzulínu a snižuje jeho účinky v periférii. Kumulace amylinu v ostrůvcích vede k jeho přeměně na amyloid, který velmi pravděpodobně také narušuje funkci  $\beta$ -buněk a může časem vést i k částečné destrukci ostrůvků a k absolutnímu poklesu sekrece inzulínu. Množství amyloidu v ostrůvcích koreluje s věkem, délkou trvání a závažností diabetu.(8)

### 5.1.2. Inzulínová rezistence (IR):

Řada autorů se domnívá, že inzulínová rezistence je tou primární poruchou, která vede k rozvoji diabetu 2. typu.(13)

Hlavním rizikovým faktorem IR je obezita, která vede k down regulaci inzulínových receptorů a tedy k určitému stupni inzulínové rezistence. Ne u všech obézních se však rozvine diabetes. Down regulace sama o sobě k rozvoji diabetu nestačí. U geneticky predisponovaných jedinců dochází k rozvoji těžší inzulínové rezistence a diabetu v důsledku kombinace receptorových a zvláště postreceptorových poruch.

Pohyb a hubnutí vedou úspěšně ke snížení inzulínové rezistence.

#### Příčiny IR:

- (a) prereceptorová - abnormální inzulín, přítomnost protilátek proti inzulínu
- (b) receptorová - down-regulace inzulínových receptorů (snížení jejich počtu)
  - poruchy inzulínového receptoru (snížená afinita receptorů pro inzulín)
- (c) postreceptorové poruchy - abnormální transdukce signálu, zvláště porucha aktivace receptorové tyrosinkinázy, abnormální průběh fosforylace (33)

Stupeň inzulínové nedostatečnosti je odrazem postupné ztráty schopnosti  $\beta$ -buněk reagovat na glukózu. Tělo se snaží inzulínovou rezistenci překonat a slinivka vyplavuje do krve stále více a více inzulínu.

**V první fázi** proto dochází ke zvýšené hladině inzulínu v krvi (kompenzatorní hyperinzulinémie). Glykémie je udržována v normálních mezích. Kompenzatorně zvýšená sekrece inzulínu postupně vyčerpává  $\beta$ -buňky (svou roli obvykle hrají i funkční, geneticky podmíněné defekty  $\beta$ -buněk), což vede k rozvoji dysfunkce  $\beta$ -buněk s poruchou sekrece inzulínu. Hyperinzulinémie je také škodlivá sama o sobě - urychluje aterosklerózu a tak u obézních zvyšuje riziko infarktů myokardu, iktů a dalších komplikací aterosklerózy.

**V druhé fázi** se inzulínová rezistence zhoršuje. I přesto, že koncentrace inzulínu je zvýšena, vzniká postprandiální hyperglykémie (buňky v pankreatu nestačí vyhovět nepřiměřeným nárokům).

**Ve třetí fázi** se inzulínová rezistence nemění, ale snížená sekrece inzulínu  $\beta$ -buňkami způsobuje hyperglykémii i nalačno a rozvíjí se manifestní diabetes.

Chronická hyperglykémie působí toxicky na  $\beta$ -buňky (dále zhoršuje jejich funkci a sekreci inzulínu) a v periferních tkáních dále prohlubuje inzulínovou rezistenci

(tzv. glukotoxicita). Stejný efekt má také zvýšená hladina mastných kyselin (tzv. lipotoxicita).(8)

V krvi pacienta můžeme obvykle detekovat hyperinzulinémii (vysokou hodnotu imunoreaktivního inzulínu IRI), vysoký C-peptid nalačno i po stimulaci jídlem a nepřítomnost markerů autoimunní inzulitidy, či jejich velmi nízkou (normální) hodnotu. (50,51)

DM 2. typu je často součástí **METABOLICKÉHO SYNDROMU**. Jedná se o soubor různých klinických, biochemických a humorálních abnormalit, které vznikají v souvislosti s poruchou účinku inzulínu v metabolismu glukózy:

- IR, hyperinzulinémie
- centrální typ nadváhy či obezita (obvod pasu  $\geq 80$  cm u žen a  $\geq 94$  cm u mužů)
- esenciální hypertenze (krevní tlak  $> 130/85$ )
- dyslipidémie (hypertriglyceridémie, snížení HDL-cholesterolu, naopak zvýšení LDL-cholesterolu)
- porušená glukózová tolerance (PGT) nebo diabetes mellitus 2. typu
- často také hyperurikémie, sklon k trombofilii a hyperkoagulaci, mikroalbuminurie, zvýšení markerů zánětu a další odchylky

Metabolický syndrom je spojen s výraznou akcelerací aterosklerózy a z toho vyplývajícími komplikacemi (ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda, atd.). (35,36,50)

## 5.2. MODY

Specifickou formou diabetu II. typu je **MODY** (Maturity Onset Diabetes of the Young).

Jde o diabetes adultního typu vyskytující se u mladistvých (před 25. rokem).(7) Projevuje se mírnou hyperglykémií bez sklonu ke ketoacidóze.

MODY diabetes patří mezi monogenní, autozomálně dominantní formy diabetu. Jedná se o geneticky heterogenní skupinu onemocnění, způsobenou mutacemi šesti genů na dlouhých raménkách chromozomů: 20, 12, 13, 17, 2 a na krátkém raménku chromozomu 7 (Tab. 4.). Pět z těchto genů kódují transkripční faktory – tato skupina MODY diabetů je označována jako MODY transkripčních faktorů. Jeden gen kóduje enzym glukokinázu, jejíž mutace způsobuje typ MODY 2 diabetu s odlišným (benigním) průběhem ve srovnání s MODY transkripčních faktorů (pankreatická glukokináza je

klíčovým enzymem pro metabolismus glukózy v  $\beta$ -buňkách pankreatických ostrůvků, kde působí jako “glukózový senzor” tj. reguluje sekreci inzulínu podle hladiny glukózy).

Vzhledem ke skutečnosti, že asi u pětiny MODY rodin nejsou ve známých lokusech mutace zjištěny, ještě pravděpodobně minimálně 1 lokus na své objevení dosud čeká.(11,20)

	<b>MODY 1</b>	<b>MODY 2</b>	<b>MODY 3</b>	<b>MODY 4</b>	<b>MODY 5</b>	<b>MODY 6</b>
<b>lokus</b>	20q	7p	12q	13q	17q	2q
<b>gen</b>	HNF-4 alfa	glukokináza	HNF-1 alfa	IPF 1	HNF-1 beta	NEUROD1
<b>funkce</b>	jaderný receptor	enzym	TF	TF	TF	TF
<b>výskyt (%MODY rodin)</b>	vzácný	10-63%	21-64%	vzácný	častý?	vzácný
<b>věk v době diagnózy</b>	po pubertě	dětství	po pubertě	po pubertě	různý	po pubertě
<b>hyperglykémie</b>	závažná	mírná	závažná	mírná?	různá	závažná?
<b>mikrovaskulární komplikace</b>	časté	vzácné	časté	vzácné?	není známo	není známo

Tab.4. Typy MODY diabetu upraveno podle Timist, 2005 (53)

### 5.3. KLINICKÉ PROJEVY

Příznaky tohoto onemocnění mohou být někdy vyjádřeny výraznou hyperglykemií a pak jsou podobné jako u diabetu 1. typu. Mnohem častěji jsou však dlouho nespecifické a diabetes je řadu let nerozpoznán, diagnostikován náhodně (viz akutní komplikace 5.4.1.), nebo se manifestuje chronickými komplikacemi diabetu. Manifestuje se zpravidla až po 40. roce věku.(8)

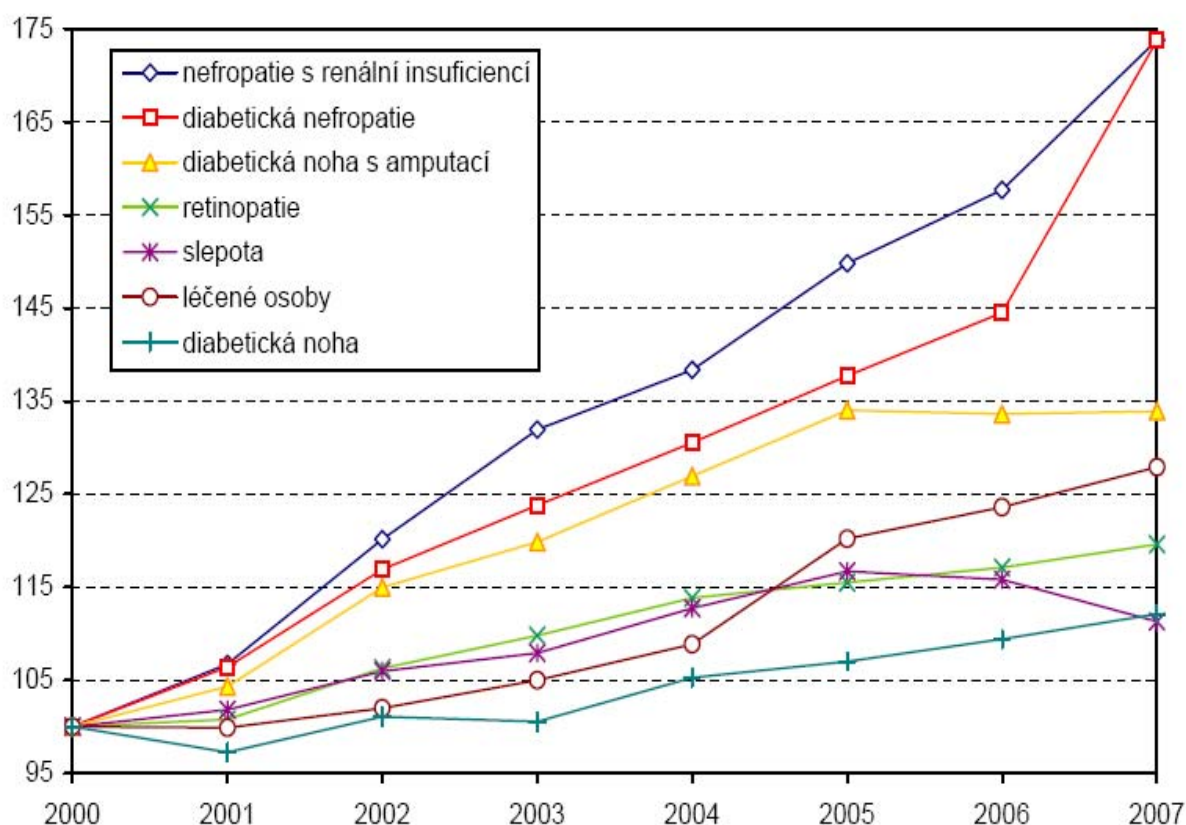
### 5.4. KOMPLIKACE

Komplikace provázející diabetes mellitus představují velkou zátěž pro pacienta a výrazně ovlivňují kvalitu i délku jeho života. Obvykle je rozdělujeme na akutní a chronické.

Klinický význam akutních komplikací ustoupil v poslední době do pozadí, zejména díky správné edukaci nemocných a možnosti domácího selfmonitoringu. S výskytem



onemocnění však narůstá počet diabetiků, u nichž se rozvinuly pozdní následky, označované jako chronické komplikace diabetu, vedoucí k narůstající morbiditě a mortalitě diabetické populace. (Obr. 1)



Obr. 1. Léčení diabetici a komplikace diabetu; převzato z ÚZIS (65)

Index rok 2000 = 100%

#### 5.4.1. Akutní komplikace diabetu

Mezi akutní komplikace řadíme **hyperglykemické stavy** (diabetickou ketoacidózu a hyperosmolální neketotickou hyperglykémii) a laktátovou acidózu, které jsou důsledkem metabolické dekompenzace.

### **A) Diabetická ketoacidóza**

Diabetická ketoacidóza byla dříve považována za komplikaci diabetu 1. typu. Dnes víme, že se vyskytuje také u diabetiků 2. typu (tzv. diabetes 2. typu náchylný ke ketóze – ketosis-prone diabetes).

Pro diabetickou ketoacidózu je typická metabolická acidóza při vzestupu ketolátek (dostávají se i do moče), hyperglykémie a deficit vody a minerálů. (39)

K rozvoji ketoacidózy dochází při dekompenzaci pacienta. Nejčastější příčiny jsou infekce, chybné podání (resp. nepodání) inzulínu a poruchy inzulínové pumpy. Někdy se jedná o první manifestaci dosud nediagnostikovaného diabetu. Na rozvoji se může podílet také stres.

Příznaky se rozvíjejí pozvolna – hodiny až dny. Projevem acidózy je Kussmaulovo dýchání a acetonový zápach dechu, popř. dušnost. Někteří pacienti mohou být agitováni, ale častější je zmatenost a obluženost.

### **B) Hyperosmolální hyperglykemický stav**

Pro hyperosmolální hyperglykemický stav je charakteristická těžká hyperglykémie (35-50 mmol/l) bez ketózy, s výraznou dehydratací a vysokou plazmatickou osmolalitou.(39)

Vyskytuje se u diabetiků 2. typu se špatně kompenzovaným diabetem.

Hyperosmolální hyperglykemický stav je často (až v 60 %) prvním projevem diabetu. Další příčinou může být nedodržování léčebných opatření, stres, interkurentní onemocnění, nedostatečný příjem tekutin, či užívání některých léků (např. diuretik).

Stav se vyvíjí obvykle dny až týdny. Bez odborného lékařského zásahu končí stav bezvědomím a smrtí.(8)

### **C) Laktátová acidóza**

Laktátová acidóza je metabolická acidóza se zvýšenou hodnotou aniontové mezery. Hladina laktátu v plazmě je vyšší než 6 mmol/l a pH pod 7,35. (39)

Mechanismus vzniku laktátové acidózy u diabetu není jasný. Může komplikovat jak diabetickou ketoacidózu, tak hyperosmolární kóma, eventuálně se vyskytne u diabetu spontánně. Laktátovou acidózu mohou také snadno vyvolat biguanidy. (33)

Počáteční příznaky jsou nespecifické (celková nevůle, nevolnost, zvracení, dezorientace, oběhová nestabilita a hyperventilace). Pokud není laktátová acidóza včas

rozpoznána, rozvíjí se těžká metabolická acidóza se vzestupem laktátu. Jedná se o život ohrožující stav. (39)

### 5.4.2. Chronické komplikace

Hlavním patofyziologickým mechanismem rozvoje chronických komplikací diabetu je hyperglykémie. Chronická hyperglykémie vede v organismu k extra- i intracelulárním patologickým procesům. Intracelulárně dochází k tvorbě sorbitolu a fruktózy, extracelulárně k neenzymatické glykosylaci proteinů.

**Tvorba sorbitolu a fruktózy :** glukóza je uvnitř řady buněk, do kterých vstupuje bez působení inzulínu, přeměněna enzymem aldoreduktázou na sorbitol, který je dále oxidován na fruktózu. Intracelulární kumulace těchto osmoticky aktivních látek se podílí na rozvoji diabetické neuropatie a mikroaneurysmat.

**Neenzymatická glykosylace :** navázání glukózy na aminoskupiny proteinů vede postupně k vytváření ireverzibilních produktů zvaných „advanced glycosylation end products“ (AGE produkty). Ty jsou příčinou řady změn v organismu, které vedou k rozvoji angiopatie na všech úrovních arteriálního řečiště. Obvykle rozlišujeme mikro- a makroangiopatie.

#### A) Diabetické mikroangiopatie

Tento pojem zahrnuje diabetickou retinopatii, nefropatii a polyneuropatii. Mikrovaskulární komplikace jsou specifické pro diabetes a nemůže k nim dojít bez dlouhodobé hyperglykémie. (8)

- Diabetická retinopatie

Rozvíjí se přibližně u 25 % nemocných s DM2. Poškozením malých cév v sítnici dochází ke vzniku malých aneurysmat (mikroaneurysma) a nových křehkých cév (neovaskularizace). Spontánní krvácení z těchto křehkých cév může vést k jizvení sítnice a tím k zhoršení vidění. Diabetická retinopatie je ve vyspělých zemích ve skupině populace do 60 let věku nejčastější příčinou slepoty.(34) Diabetickou retinopatii zhoršuje špatná kompenzace diabetu, hypertenze a kouření.

- Diabetická nefropatie

V časně fázi se projevuje zvýšenou mikroalbuminurií, později ledviny ztrácejí svou schopnost čistit a filtrovat krev. Diabetická nefropatie patří v naší republice (v rozvinutých zemích obecně) mezi hlavní indikace k zařazení do chronické dialyzační terapie.(34)

- Diabetické neuropatie

Vývoj a stupeň je rovněž závislý na trvání diabetu a na jeho kompenzaci. Nejčastěji se rozvíjí periferní *senzomotorická polyneuropatie*. Časným příznakem je snížená citlivost senzorických nervových zakončení. Později se projevuje parestéziemi na dolních končetinách, bolestmi, ztrátou citlivosti (zj. na teplo a bolest), svalovou atrofií či areflexií. Motorické poruchy se objevují až v pokročilých stádiích. Druhou nejčastější formou je *autonomní diabetická neuropatie* charakterizovaná kardiovaskulární manifestací, gastroparézou (zpomalené vyprazdňování žaludku), střevními poruchami (průjem nebo zácpa), poruchami močového měchýře (inkontinence), impotencí.

Diabetická neuropatie je společně s diabetickou angiopatií hlavním mechanismem vzniku SYNDROMU DIABETICKÉ NOHY. Tento syndrom je podle WHO definován jako ulcerace nebo destrukce tkáně na nohou u diabetiků spojená s neuropatií, s různým stupněm ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) a často i s infekcí. Zevními vyvolávajícími příčinami ulcerací bývají otlaky nejčastěji z nesprávné obuvi, spáleniny, drobné úrazy a dekubity, ragády, plísňové infekce a panaritida.(59)

## **B) diabetické makroangiopatie**

Jako makroangiopatie se označuje poškození větších cév aterosklerózou. Progresi aterosklerotického procesu výrazně akceleruje nejen tvorba AGE produktů, ale také dislipoproteinémie, hypertenze a hyperinzulinémie.(8,38) Makroangiopatie je příčinou závažných kardiovaskulárních komplikací, mezi které řadíme ICHS s rizikem infarktu myokardu (je nejčastější příčinou smrti diabetiků), cévní mozkovou příhodou (3. nejčastější příčinou smrti) a ICHDK .

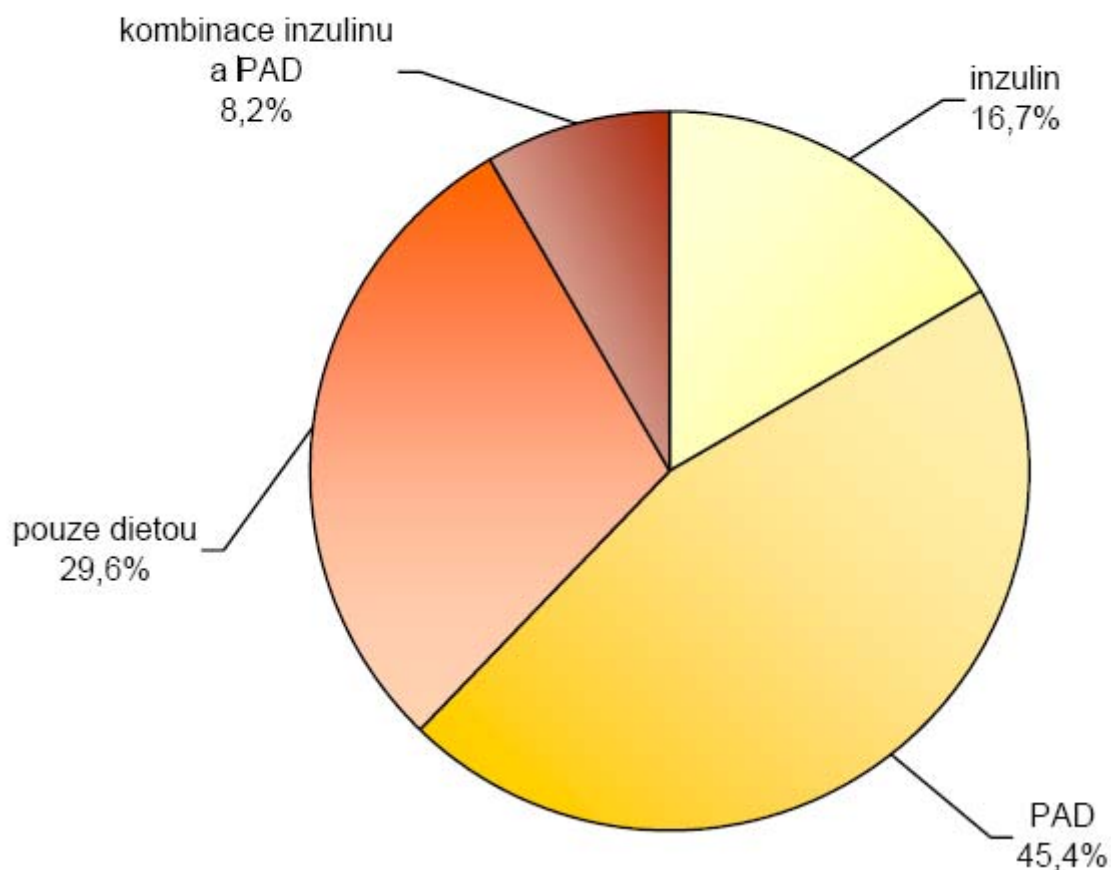
### *5.4.3. Nespecifické komplikace*

DM vede k nespecifickým poruchám imunitní odpovědi, což je důvodem zvýšené náchylnosti diabetiků k infekcím. Nejčastěji jsou to kožní, respirační (včetně TBC) a močové infekce. Často se u diabetiků setkáváme se špatným hojením ran. (8)

## 5.5. LÉČBA

Z celkového počtu léčených diabetiků je dieta dostačujícím prostředkem léčby pouze pro 29,6%. Jejich podíl každoročně mírně klesá a narůstá podíl pacientů léčených

perorálními antidiabetiky (45,4 %) nebo inzulinem (16,7 %), případně kombinovanou léčbou (8,2 %) - Obr.2.



Obr. 2. Léčba diabetu v roce 2007 převzato z ÚZIS (65)

Léčba hyperglykémie je u nemocného s diabetem 2. typu součástí komplexních opatření, která zahrnují i léčbu hypertenze, dyslipidemie, obezity a dalších projevů metabolického syndromu. Cílem je dosáhnout cílových hodnot glykemií, ideálně při nepřítomnosti závažných hypoglykemií a bez hmotnostních přírůstků (případně s hmotnostním úbytkem).

Léčebný plán má být stanoven tak, aby se dosáhlo optimální kompenzace diabetu s přihlédnutím k věku, zaměstnání, fyzické aktivitě, přítomnosti komplikací, přidruženým chorobám, sociální situaci a osobnosti nemocného. (59) Primárním ukazatelem glykemické kontroly je hodnota glykovaného hemoglobinu (HbA1c).

V nedávné době byly uveřejněny výsledky studie ADVANCE, která sledovala vztah intenzivní kompenzace a kardiovaskulárních komplikací u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Tato studie prokázala, že snaha o těsnou kompenzaci ( $HbA_{1c}$  nižší nebo rovný 6,5 % podle kalibrace Diabetes Control and Complications Trial /DCCT/) je při zvolení správné léčebné strategie nejen bezpečná (ve vztahu k hypoglykemiím), ale také přínosná, neboť snižuje riziko závažných mikrovaskulárních komplikací. Naopak předchozí studie VADT a ACCORD zhodnotili intenzivní kompenzaci jako vysoce rizikovou. Studie ACCORD byla dokonce pro zvýšení mortality u intenzivně léčených pacientů (pravděpodobně z důvodů těžkých hypoglykemií) předčasně zastavena. (1)

### *5.5.1. Nefarmakologická léčba*

Tvoří základ léčby diabetu 2. typu. Zahrnuje volbu individuálně stanovených dietních opatření a fyzické aktivity.

Doporučována je dieta diabetická (s příslušným limitem sacharidů), u obézních jedinců dieta redukční s ohledem na stupeň nadváhy. (59) Pokles tělesné hmotnosti je u diabetiků 2. typu prakticky vždy provázen snížením glykémie. Zvýšená tělesná aktivita navíc zlepšuje lipidový profil, snižuje hodnoty krevního tlaku a redukuje celkové kardiovaskulární riziko.

Třebaže se jedná o nejbezpečnější, nejlevnější a velmi účinný přístup, jehož výsledky se dostavují již během několika týdnů, dlouhodobá spolehlivost takových programů je velmi nízká a v drtivé většině případů je nezbytné přistoupit k farmakologické intervenci.

### *5.5.2. Farmakologická léčba*

Léčba je vedena tak, aby se výsledky co nejvíce přiblížily cílovým hodnotám a to vždy s nejmenší dávkou farmaka a při respektování všech kontraindikací léčby. Při léčbě se klade důraz na postprandiální glykémie, které jsou rizikem rozvoje aterosklerotických komplikací.

Léčba inzulinem se doporučuje obvykle až tehdy, pokud se neuspěje s dvojkombinací perorálních antidiabetik (PAD). (59)

#### **Dělení PAD podle mechanismu účinku :**

**1. Inzulínová sekretagoga:** preparáty, které přímým působením na  $\beta$ -buňky pankreatu stimulují sekreci inzulinu. Patří sem dlouho známé *deriváty sulfonylurey*, zvyšující

zejména bazální inzulinovou sekreci. Dále přípravky zvané *glinidy*, které krátkodobě stimulují postprandiální sekreci inzulinu. Užívají se s jídlem a v jistém smyslu nahrazují dávky krátkodobě působících inzulinů. Nově sem patří také *inkretinové hormony*: Exenatid – agonista glukagon-like peptidu-1 (GLP 1). Hlavní účinek GLP-1 spočívá ve stimulaci uvolnění inzulinu po příjmu potravy. Za normálních okolností však nezpůsobuje hypoglykémii. Gliptiny - inhibitory dipeptidyl peptidázy 4 (DPP4) prodlužují biologický poločas GLP1 cestou inhibice jeho odbourávání.(40,59) Inkretinové hormony byly schváleny pro léčbu pacientů s DM2 v kombinaci s metforminem a/nebo sulfonylureovými preparáty. (10,17,21,29,45)

**2. Inzulínové senzitizery:** léky, které zlepšují citlivost k inzulinu. Sem patří *biguanidy* (metformin) a *thiazolidindiony* (glitazony). Výjimečnost této lékové skupiny tkví v tom, že ovlivňují nejen glykémii, ale zlepšením IR v různé míře i všechny ostatní složky metabolického syndromu.

**3. Ostatní perorální antidiabetika:** problém nedostatečné postprandiální sekrece inzulinu spojené s hyperglykémií po jídle je u některých nemocných možné řešit zpomalením resorpce glukózy z gastrointestinálního traktu (GIT) pomocí inhibitoru glukosidáz akarbozy (inhibitory  $\alpha$ -glukosidáz). V širším slova smyslu lze mezi perorální antidiabetika řadit také antiobezitika.

## 6. GESTAČNÍ DIABETES MELLITUS

Gestační diabetes mellitus (dále GDM) je definován jako jakýkoli stupeň intolerance sacharidů vznikající poprvé v průběhu gravidity. Jde o nejčastější metabolickou poruchu v těhotenství, která může mít závažné krátkodobé i dlouhodobé následky pro matku i dítě. (59). Na rozvoji onemocnění se podílí genetická predispozice, nadměrné přibývání na váze (rozvoj inzulinové rezistence) a zvýšená hladina kontraregulačních hormonů.

Incidence GDM je v literatuře udávána v rozmezí 0,5-15 % a to v závislosti na způsobu diagnostiky (zda je prováděn rutinní screening, či je indikováno vyšetření tolerance sacharidů pouze při přítomnosti rizikových faktorů GDM). (59)

## 7. DIABETES MELLITUS JAKO SOUČÁST JINÝCH ONEMOCNĚNÍ ČI STAVŮ (SEKUNDÁRNÍ DIABETES)

Do této skupiny se řadí diabetes doprovázející definovaná onemocnění genetická, endokrinní, zánětlivá, diabetes vyvolaný podáváním léků apod.(Tab.5.) Ze všech výše uvedených stavů je nejčastější DM při onemocněních exokrinní funkce pankreatu, dále léky a chemikáliemi indukovaný DM. Léky indukovaný diabetes nejčastěji vzniká při podávání glukokortikoidů (tzv. steroidní diabetes). (57) Vzhledem k přítomnosti základního onemocnění nebývá většinou stanovení diagnózy problematické. (51)

Genetické defekty funkce $\beta$ -buněk (nejčastěji MODY diabetes)
Genetická porucha účinku inzulínu (např. A-typ inzulínové rezistence)
Nemoci exokrinní funkce pankreatu (např. pankreatitis, neoplazma, pankreatektomie, fibróza)
Endokrinopatie (např. akromegálie, Cushingův syndrom, thyrotoxikóza,...)
Léky a chemikáliemi indukovaný DM (např. glukokortikoidy, thiazidy,...)
Infekce (např. kongenitální rubeola, cytomegalovirus)
Zřídkaivé formy autoimunního DM (např. protilátky proti receptorům pro inzulín)
Jiné genetické syndromy s občasným výskytem DM (např. Downův, Klinefelterův syndrom)

Tab. 5. Jiné specifické typy diabetes mellitus, převzato z Martinka E. 1999 (32)

## 8. LABORATORNÍ METODY U DM

Biochemické vyšetření diabetika sleduje tyto hlavní cíle:

- určení kompenzace glukózového metabolismu
- pomoc při diferenciální diagnostice typů a určení stádia choroby
- stanovení přiměřené terapie a monitorování její účinnosti
- včasné odhalení komplikací



### **Vyhledávání (screening) diabetu**

K vyhledávání diabetu se používá hodnocení glykémie, kdežto vyšetření moče (glykosurie) nepostačuje a bylo ze screeningu vyloučeno. Glykémie se provádí v plné kapilární krvi nebo v žilní plazmě.

Provádí se:

- jednou za dva roky u nerizikových jedinců jako součást preventivních prohlídek
- jednou ročně u osob se zvýšeným rizikem (nemocní s kardiovaskulární příhodou v anamnéze, věk nad 40 let, obezita, arteriální hypertenze, dislipidémie či hyperlipoproteinémie, výskyt poruchy glukózové tolerance v anamnéze, gestační diabetes či porod plodu o hmotnosti nad 4 kg)
- okamžitě u osob se zjevnými příznaky

Screening diabetu z důvodu vyššího věku je předmětem diskuse. Jedná se však o velmi závažný rizikový faktor a proto je screening i v tomto případě žádoucí. Mluví pro to i vysoké procento nediagnostikovaných diabetiků ve vyšších věkových kategoriích (až 50 %). (59)

### **Diagnostika diabetu**

Při podezření na diabetes mellitus je třeba potvrdit diagnózu onemocnění standardním postupem. O diagnóze diabetu svědčí:

- přítomnost klinické symptomatologie provázené náhodnou glykemií vyšší než 11,0 mmol/l a následně glykemií v žilní plazmě nalačno vyšší než 7,0 mmol/l (stačí jedno stanovení)
- při nepřítomnosti klinických projevů a nález glykémie v žilní plazmě nalačno vyšší než 7,0 mmol/l po osmihodinovém lačnění (ověřit alespoň 2x)
- nález glykémie za dvě hodiny při orálním glukózovém testu (oGTT) vyšší nebo rovné 11,1 mmol/l (2,4,5,48,59,60)

### **Průběžná vyšetření**

Frekvence návštěv je závislá na dosažené metabolické kompenzaci, změnách terapeutického režimu, přítomnosti komplikací a celkovém zdravotním stavu pacienta. Průběžná vyšetření se opět opírají o anamnézu, fyzikální vyšetření a laboratorní vyšetření.

Laboratorní vyšetření:

- glykémie nalačno či postprandiálně
- glykovaný hemoglobin jednou ročně u všech pacientů, u pacientů léčených inzulínem

- jednou za čtvrt roku, u pacientů léčených PAD jednou za čtvrt až půl roku
- vyšetření, u nichž byla zjištěna patologická hodnota
  - moč semikvantitativně (cukr, bílkovina, ketony)
  - albuminurie kvantitativně (u diabetiků mladších 70 let jednou ročně při negativním nálezu, při patologických hodnotách je třeba postupovat individuálně)
- Jednou ročně je diabetik vyšetřen komplexně.(59)

## 8.1. GLUKÓZA

Základní biochemickou informací sacharidového metabolismu je stanovení koncentrace glukózy v krvi.

Koncentrace glukózy v krvi (glykémie) je udržována v konstantním rozmezí hormonálně: inzulín glykémii snižuje, glukagon, adrenalin, kortizol a růstový hormon ji zvyšují. Fyziologicky se koncentrace glukózy v plazmě zvyšuje po jídle (postprandiálně), klesá při hladovění.

Bez inzulínu se glukóza do buněk nedostává a zůstává ve zvýšeném množství v krvi, popř. je vylučována močí.

### **Rozdíly glykémii v séru a plazmě; plné, kapilární a venózní krvi**

Z dostupných dat nelze zcela jednoznačně určit, zda mezi hodnotami koncentrací glukózy v séru a plazmě jsou významné systematické rozdíly.(64) Naprostá většina literárních dat považuje obě hodnoty za rovnocenné. Doporučení WHO a ADA však jednoznačně zmiňují pouze použití plazmy a vůbec nezmiňují krevní sérum. (60)

Koncentrace glukózy v plné krvi je nižší než její koncentrace v plazmě (největší rozdíly sledujeme u novorozenců). Tento rozdíl je dán rozdílným obsahem vody v obou materiálech, resp. hematokritem, protože koncentrace glukózy v erytrocytech je nižší než v plazmě. Rozdíl koncentrací glukózy je u vzorků s normálním hematokritem průměrně 11%. (64)

Průměrný rozdíl koncentrace glukózy mezi kapilární a venózní krví je nalačno 0,1 mmol/l a postprandiálně 1,7 mmol/l (vyšší koncentrace je v kapilární krvi).(64)

## **Analytické podmínky**

Koncentrace glukózy v plazmě se stanovuje především enzymaticky (fotometrie, reflektometrie, ampérometrie). (64)

Původní nespecifické metody byly založeny na oxidoredukčních vlastnostech glukózy v alkalickém prostředí a patří historii: oxidace glukózy roztokem kyseliny pikrové na červenou kyselinu pikraminovou, oxidace hexakynoželézitanem a stanovení jeho nadbytku titračně jodometricky nebo fotometricky přes berlínskou modř, apod.

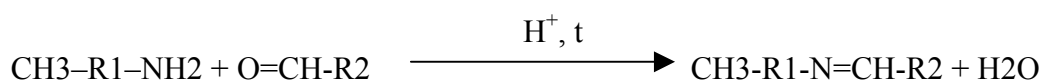
Z chemických metod má význam pro svou specifitu jedině stanovení glukózy o-toluidinem. Podobně reagují i cukry galaktóza a manóza, protože ale nejsou v biologických tekutinách obsaženy, je stanovení pro glukózu v séru, plazmě, moči a likvoru specifické. Tato metoda poskytuje výsledky prakticky shodné s enzymovými metodami a v případě nouze by je mohla nahradit.

Chemické metody byly plně nahrazeny rychlými enzymatickými metodami, a to zejména s hexokinázou (HK) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázou (G6PD), nejčastěji ale glukózaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD).

### Principy metod:

#### **A) Stanovení glukózy o- toluidinem**

Provádí se v prostředí ledové kyseliny octové, kdy o-toluidin (o-aminotoluen) kondenzuje s glukózou za zvýšené teploty na glykosylamin, který se stabilizuje odštěpením vody na Schiffovu bázi.



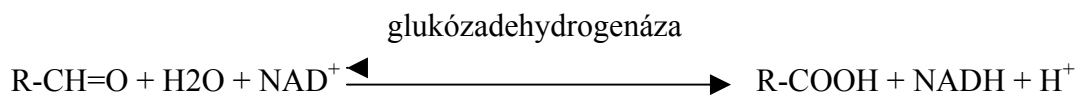
R1 je benzenové jádro o-toluidinu, R2 je glukózový zbytek – (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>)

Měří se zeleně zbarvený produkt při 630 nm.

Krev, sérum/plazmu je nutné před vlastní analýzou deproteinovat, např. kyselinou trichloroctovou a k analýze použít supernatant. (26)

#### **B) Stanovení s glukózadehydrogenázou**

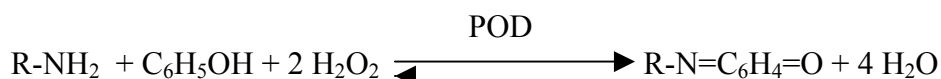
Glukóza se oxiduje NAD<sup>+</sup> za enzymové katalýzy na kyselinu D-glukuronovou (δ-D-glukonolakton):



Měříme nárůst absorpance při 340 nm způsobený vznikem nikotinamidadenindinukleotidu (NADH). (26)

### C) Stanovení s glukózaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD) oxidační kopulací

Principem je oxidace glukózy na D-glukonolakton a peroxid vodíku, který se využívá buď k oxidaci některých leukobází (aromatické diaminy typu o-tolidin, o-dianisidin, aj.) nebo častěji k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu (AAP) s fenolem na chinoniminové barvivo:



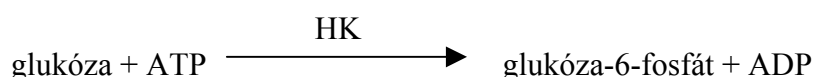
Měří se změna absorpance za minutu nebo výsledné zbarvení inkubační směsi po 15 minutách v pásu kolem 500 nm. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci glukózy.

Reakce je rušena redukujícími látkami (vzhledem k poměrně vysoké koncentraci glukózy v plazmě endogenní vitamin C prakticky analýzu neruší).

Na stejném principu pracují i osobní glukometry: komponenty reakce jsou součástí reakční zóny testovacího proužku; po aplikaci krve dochází podle výše uvedených reakcí k produkci barevné látky, intenzita zbarvení je měřena reflektometricky. (26)

### D) Stanovení s hexokinázou a glukóza-6-fosfátdehydrogenázou

Je vysoce specifické a proto je základem referenční metody (s deproteinací). V praxi se používá bez deproteinace.



G6PD - glukóza-6-fosfátdehydrogenáza

Měří se absorbance v pásu kolem 340 nm. V praxi se někdy místo  $\text{NADP}^+$  používá  $\text{NAD}^+$ . (26)

**E) Stanovení speciálními analyzátory** určenými jen pro analýzu glukózy (také některé glukometry). Principem je enzymatické stanovení s GOD kotvené na síťce nebo v reakční zóně nasákavého proužku. Vznikající peroxid vodíku se stanovuje ampérometricky. Měří se elektrodová oxidace peroxidu na platinové elektrodě (Clarkova elektroda) (26)



### *8.1.1. Glykémie nalačno - (FPG, Fasting Plasma Glucose)*

#### **Význam a role**

Stanovení glykémie nalačno má nezastupitelnou úlohu při určení diagnózy diabetu mellitu. Dále se využívá k vyhledávání osob se zvýšeným rizikem diabetu mellitu.

#### **Preanalytické podmínky**

Krev se odebírá po hladovění (lačnění) přes noc, minimálně však po dobu 8 hodin. Jakákoli fyzická námaha musí být vyloučena, stejně jako kouření. Pacient má být při odběru v klidové poloze (v sedě). Vzorek žilní krve se odebírá do odběrové nádoby s obsahem inhibitoru glykolýzy obvyklou kombinací je směs fluoridu sodného a EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina)

Plazma musí být oddělena od krevních elementů do 60 minut. Pokud je vzorek odebrán do zkumavek bez stabilizátorů glykolýzy, měl by být separován do 30 minut. Stabilita glukózy ve vzorku závisí na teplotě, skladování, bakteriální kontaminaci a glykolýze : 8 hodin při 20 – 25 °C; 72 hodin při 4 – 8 °C a ve fluoridové plazmě je stabilita 24 hodin při 20 - 25 °C. (48,49,60)

Diagnostická kritéria pro FPG přijatá Českou společností klinické biochemie (ČSKB) a Českou diabetologickou společností (ČDS) byla v červenci 2005 převzatá od Americké asociace pro diabetes (ADA). Tato kritéria jsou uvedena v následující tabulce (Tab..6.).

vyloučení Diabetu mellitu	< 5,6 mmol/l
porušená glukózová tolerance	≥ 5,6 mmol/l až < 7,0 mmol/l
Diabetes mellitus	≥ 7,0 mmol/l (nutno potvrdit opakovaným měřením)

Tab. 6. diagnostická kritéria

Zvýšené riziko diabetu je charakterizováno intervalem hodnot 5,6 - 6,99 mmol/l. Pro tento stav, označovaný ADA jako Impaired Fasting Glucose (IFG) nebo také prediabetes, je navržen český termín „Hraniční Glukóza Nalačno“ (HGL). (2,4,5,37,48,60,64)

### 8.1.2. Glykémie po jídle (postprandiální glykémie, PPG)

PPG je koncentrace glukózy v krvi v době mezi 60. – 120. minutou po požití jídla.

Toto rozpětí souvisí s odlišnou dobou maxima u různých osob. U zdravého jedince dosahuje glykémie po jídle maximální hodnoty v době okolo jedné hodiny po jídle, u pacienta s diabetem 2. typu je to naopak v době blížící se 120. minutě po jídle. U zdravých jedinců nepřesahuje hodnota PPG po běžném jídle 6,8 mmol/l.

#### Význam a role

Základní indikací k měření PPG je potřeba rozhodnutí o léčebné strategii u pacientů s diabetem 2. typu, nesrovnalost mezi glykemií nalačno a HbA1c, nově vzniklé či rychle progredující mikrovaskulární komplikace.

#### Preamalytické podmínky

Krev se odebírá nejčastěji hodinu (popř. ještě po 2 hodinách) po jídle do vhodných zkumavek s protisrážlivým činidlem. Ostatní podmínky jsou stejné jako u stanovení FPG. (37,60)

## 8.2. ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST (oGTT)

### **Význam a role**

Orální glukózový toleranční test se používá k potvrzení diagnózy diabetes mellitus v případě, že diagnóza není jednoznačně potvrzena nálezem FPG vyšší než 7,0 mmol/l. Jde jednak o stavy s hraniční glukózou nalačno (IFG, 5,6 - 6,99 mmol/l), jednak v situacích s FPG nižší než 5,6 mmol/l, při nichž bylo vysloveno podezření na poruchu tolerance glukózy z předchozích vyšetření nebo jedná-li se o jedince se zvýšeným rizikem vzniku diabetu. (doporučení WHO). Při nálezu porušené glukózové tolerance (PGT) se oGTT opakuje ve dvouletých intervalech.

WHO i ADA doporučují použít oGTT k diagnóze gestačního diabetu mellitu. Používá se v těhotenství u skupin se zvýšeným rizikem vzniku diabetu. V tomto případě se test provádí ve 24. - 28. týdnu gravidity.

### **Preanalytické vlivy**

K dosažení potřebné diagnostické správnosti oGTT se požaduje lačnění před odběrem po dobu 8 - 14 hodin, předchozí třídenní dieta se zvýšeným přísunem sacharidů v potravě v množství minimálně 150 g za den a neomezovaná fyzická aktivita ve stejném období. Malabsorpce, nausea a kouření ovlivňují výsledek oGTT. Snížení obsahu sacharidů v dietě sníží diagnostickou senzitivitu oGTT. (60)

### **Analytické podmínky**

Biologickým materiálem pro oGTT je plazma (sérum) žilní krve.

1. Odebere se vzorek krve před podáním roztoku glukózy a změří se FPG. Tato hodnota by měla být pod 8 mmol/l. Při vyšší glykémii se roztok glukózy nepodává z důvodu příliš vysoké zátěže pro organismus. U těhotných je tato hranice 5,6 mmol/l.

2. Podá se 75 g glukózy v 250-350 ml vody a vypije se během 5-15 minut. Během pokusu pacient nesmí kouřit, jíst, pokud možno nebrat léky, které ovlivňují výsledek testu a nevykonávat žádnou fyzickou aktivitu.

3. Odebere se vzorek krve za 2 hodiny (v některých případech i za 1 hodinu), kde se hodnotí glykémie. Průběh změn glykémie je zobrazen na Obr.3. Současně s odběrem krve je požadována také moč ke sledování glykosurie a ketonurie.

vyloučení Diabetu mellitu	< 7,8 mmol/l
porušená glukózová tolerance	$\geq 7,8$ mmol/l až < 11,1 mmol/l
Diabetes mellitus	$\geq 11,1$ mmol/l

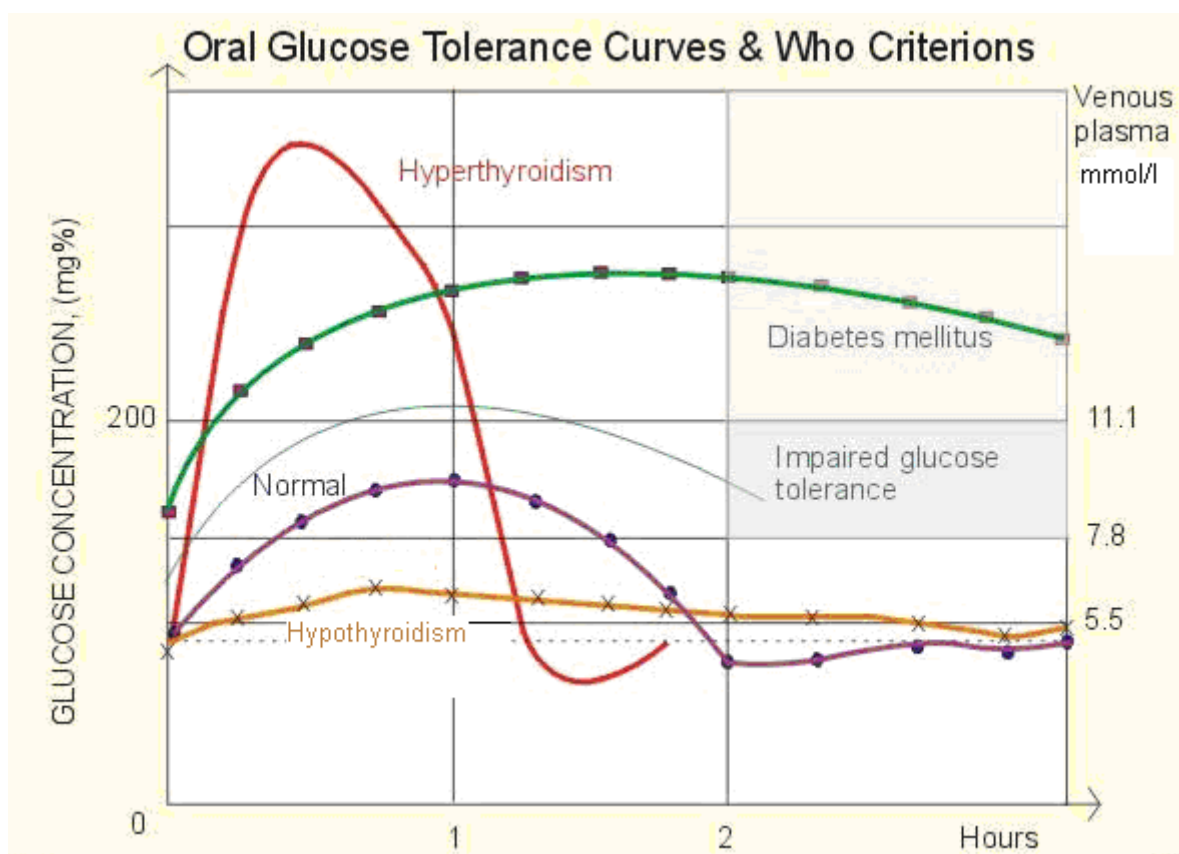
Tab. 7. Diagnostická kritéria

Rozhodovací limit oGTT pro diagnózu diabetu mellitu je definován jako hodnota plazmatické glukózy v žilní krvi ve druhé hodině po zátěži  $\geq 11,1$  mmol/l (Tab.7). K vyslovení diagnózy musí být překročení tohoto rozhodovacího limitu potvrzeno opakovaně.

Gestační diabetes je laboratorně diagnostikován, je-li dosaženo alespoň jednoho ze dvou uvedených kritérií:

FPG  $\geq 5,6$  mmol/l

glukóza ve 120. minutě po zátěži  $\geq 7,8$  mmol/l



Obr. 3. Průběh perorální glukózové křivky, převzato z Paulev, 2000 (41)



Průběh vícebodové perorální glykemické křivky po zátěži glukózou (nebo sacharidy) lze rozdělit do tří úseků:

a) Rychlost resorpce glukózy ze střeva udává tvar vzestupné části křivky. Tato část může být strmá při **hypertyroidismu** (zvýšené prokrvení trávicího ústrojí - rychlejší resorpce glukózy do krve) nebo naopak může být plochá při malabsorpci – **hypotyroidismu**.

b) Vrcholová část křivky je závislá na dobré funkci jater (tvorba jaterního glykogenu) a na účinku inzulínu v játrech. **Za normálních okolností** je 80% vstřebané glukózy přeměněno v játrech na glykogen. V krvi vena portae je koncentrace až 22,2 mmol/l, zatímco do periferního oběhu se dostane maximálně 11,1 mmol/l. Vzestup glykémie provokuje exkreci inzulínu do krevního oběhu. Vrcholu glykémie je dosaženo za 45-60 minut. U začínajícího **diabetu** 1. typu, kdy nastává snížení exkrece inzulínu, není glukóza přeměněna v játrech v dostatečné míře na glykogen a vrchol glykémie glykemické křivky přesahuje hodnotu 11,1 mmol/l a jeho maximum bývá i později než za 60 minut. Při onemocnění jater kapacita jaterních buněk nestačí vstřebanou glukózu metabolizovat nebo se do periferního oběhu přes portokavální zkratky dostane více glukózy. Vrchol rovněž převýší hraniční hodnotu; vrcholová hodnota přetrvává i déle než 60 minut, ale návrat ve 120 minutě je již normální (utilizace není porušena - zvonový tvar křivky). U **hypertyreózy** rychlé vstřebání glukózy způsobí, že je rovněž převýšena hranice 11,1 mmol/l, ale návrat k výchozí hodnotě je rychlý (gotický tvar křivky).

c) Sestupná část křivky je závislá na účinku inzulínu a je mírou utilizace glukózy. Její zpomalený a nedostatečný návrat k normě je klasickým projevem **diabetu**. (33,44,64)

### 8.3. INTRAVENÓZNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST

Používá se tam, kde je porušená absorpce glukózy ze střeva. Na rozdíl od perorálního testu však u něho chybí stimulace sekrece inzulínu enterohormony.

Glukóza se podává intravenózně v dávce 0,33 nebo 0,5 g/kg. Krev se odebírá 6krát po 10 minutách po aplikaci.

Počítá se tzv. asimilační koeficient pro glukózu (K), který je nepřímo úměrný době, za kterou klesne glykémie z nejvyšší hodnoty na polovinu (biologický poločas  $T_{1/2}$  v minutách). K udává procentuální pokles glykémie za jednu minutu.

$$K = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} * 100 = \frac{69,3}{T_{1/2}}$$

#### Hodnocení

Asimilační koeficient pro glukózu je fyziologicky vyšší než 1,2. Pro diabetes svědčí hodnota méně než 1.(44)

### 8.4. GLYKOVANÝ HEMOGLOBIN (GHb)

Glykace molekuly hemoglobinu vzniká neenzymovou reakcí glukóza-6-fosfátu nebo glukózy s NH<sub>2</sub>-skupinou terminálního valinu β-řetězce hemoglobinu. Nejprve vzniká Schiffova báze (aldimin), která je labilní a snadno disociovatelná; přesmykuje se na stabilní ketoamin. Z reakční rovnováhy vyplývá, že podíl glykovaného hemoglobinu tvořený in vivo je úměrný koncentraci volné glukózy. Proto u pacientů s diabetes mellitus, u kterých je hladina glukózy trvale zvýšena, se vytvoří větší množství glykovaného hemoglobinu. Reakce probíhá pomalu a postupně. Hemoglobin je umístěn v erytrocytech, takže děje, které se na jeho molekule odehrávají, jsou vázány na dobu života červené krvinky (tj. 120 dní). Stanovení GHb ukazuje na průměrný stav glykémie za dobu 4-8 týdnů. Hodnota glykovaného hemoglobinu nemusí být stálá a může kolísat i během glykemické křivky. Je to způsobeno tím, že některé metody nedokáží odlišit formu labilní (Schiffovu bázi - odráží situaci za 24 hodin) od formy stabilní (ketoamin - odráží střední hodnotu glykémie za 4-6 týdnů).

Určitými metodami lze oddělit jednotlivé deriváty a podskupiny hemoglobinu (Hb). Bylo prokázáno, že u diabetiků se zvyšuje frakce A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>). Přesněji se jedná o N-(1-deoxyfrokto-1-yl) hemoglobin beta, neboli DOF hemoglobin. V organismu při dlouhodobém zvýšení glykémie podléhají glykaci i jiné bílkoviny. To souvisí s poškozením některých orgánů a tkání (viz. chronické komplikace). (12, 19,22,23,33,47,,64)

## Význam a role

Jedná se o rutinní a nejvíce efektivní nástroj monitorování průběhu terapie diabetu a nejlepší způsob kontroly dlouhodobého stavu koncentrace glukózy v krvi pacientů. V blízké perspektivě též další nástroj laboratorní diagnózy a screeningu diabetu. (60,64)

### Indikace stanovení glykovaného hemoglobinu

- labilní diabetes (velké výkyvy glykémie)
- "problémový" pacient
- nový pacient bez informace o předcházejících výsledcích
- pacient s interkurentním onemocněním (např. bronchopneumonie)
- potvrzení a správného vedení samokontroly
- objasnění "stresové" hyperglykémie (např. při akutním infarktu myokardu, po těžším chirurgickém výkonu).(33)

	IFCC %	IFCC mmol/mol
vyloučení diabetu	2,8-4,0	28-40
výborná kompenzace	< 4,5	< 45
uspokojivá komp.	4,5-6,0	45-60
neuspokojivá komp.	> 6,0	> 60

Tab. 8 Referenční hodnoty podle IFCC

	DCCT %	IFCC mmol/mol
vyloučení diabetu	4,0-6,0	20-42
uspokojivá kompenzace	< 7,0	< 53
neuspokojivá kom.	> 8,0	> 64

Tab. 9 Referenční hodnoty podle DCCT

Problémem zůstávají dvě uznávané kalibrace, ze kterých se odvozují výsledné hodnoty GHb (Tab. 8. a 9.). Podle nového doporučení EASD, ADA, IDF, IFCC mají být výsledky měření vázané na referenční metodu IFCC .

Doporučení dále stanovuje nové jednotky měření: mmol HbA<sub>1c</sub> /mol Hb (celkový hemoglobin) (64):

- Převod výsledků z DCTT na IFCC:  $\% \text{ DCCT} = (0,915 * \% \text{ IFCC}) + 2,15$
- Převod výsledků z % na novou jednotku měření:  $\% \text{ IFCC} * 10 = \text{mmol/mol HbA}_{1c}$

### **Preanalytické podmínky**

Plná krev odebraná ze žíly, nebo kapilární krev odebraná po vpichu z prstu do odběrové nádoby obsahují antikoagulační činidlo, obvykle EDTA, popř. heparin.

Stabilita HbA<sub>1c</sub>:

3 dny při 15 - 25°C

1 týden při 4°C

minimálně 1 rok při -70°C a nižší teplotě

Pro skladování při -20°C se uvádějí kontroverzní literární údaje o stabilitě a proto není tento způsob skladování doporučen.(60,64)

### **Analytické podmínky**

Hlavní metody analýzy jsou většinou založeny na oddělení frakce hemoglobinu A<sub>1c</sub> od ostatních některou z uvedených separačních technik nebo chemickým stanovením v oddělených a promytých erytrocytech přes 5-hydroxymetyl-2-furaldehyd s kyselinou 2-thiobarbiturovou (fotometrické stanovení). Lze užít i radioimunoanalýzu RIA s antisérem proti lidskému GHb.

Používané separační techniky: chromatografie na mikrokolonách s vhodným katexem (dnes převažuje), elektroforéza na agarózovém gelu, HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), isoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu, afinitní gelová chromatografie.

#### Chromatografické stanovení na mikrokolonách

Příkladem afinitní chromatografie je kolona plněná agarózou s kovalentně navázanou kyselinou aminofenylboritou (trihydroxyaminofenylboranem). Ta má specifickou afinitu ke ketoformě GHb, s níž vytváří komplex. Ostatní neglykované frakce Hb kolonou protečou.

#### Imunochemické stanovení

Je založeno na inhibiční latexové aglutinaci. Latexové částice jsou potaženy specifickou myší protilátkou proti lidskému HbA<sub>1c</sub>. Stanovení má několik kroků. Nejprve jsou lyzovány erytrocyty a Hb rozštěpen proteázou. Následně je v alikvotu vzorku stanoven celkový Hb přes alkalický hematin a následně HbA<sub>1c</sub> inhibiční latexovou aglutinací.

Za přítomnosti HbA<sub>1c</sub> ve vzorku dochází ke kompetici o protilátku na latexových částicích s aglutinačním činidlem a tím ke zpomalení aglutinace. Rychlost aglutinace

se sleduje měřením absorpance při 600 nm. Obsah HbA<sub>1c</sub> se vyjadřuje v procentech jako podíl k obsahu celkového Hb. (26)

### Interference

*Falešná negativita:* u stavů se zkráceným přežíváním erytrocytů – např. hemolytická onemocnění, hemoglobinopatie, výrazná nebo chronická ztráta krve, těhotenství, zvýšené hladiny celkového bilirubinu, časté hypoglykémie.

*Falešná pozitivita:* hypochromní anémie, urémie, zvýšená hladina sérových lipidů. (44)

### Výpočet střední koncentrace glukózy z hodnot HbA<sub>1c</sub>

Střední koncentrace glukózy (mmol/l) =  $1,73 \cdot \text{HbA}_{1c} + 0,20$

Každá změna hladiny HbA<sub>1c</sub> o 1 % odpovídá změně střední koncentrace glukózy o 1,7 mmol/l (33)

## 8.5. FRUKTÓZAMIN

Není součástí rutinního souboru vyšetření diagnózy a terapie diabetiků.

Stanovení fruktózaminu lze doporučit jen v případech, kdy není možné spolehlivé měření HbA<sub>1c</sub> (hemoglobinopatie, anémie), ale nelze je považovat za rovnocennou náhradu stanovení HbA<sub>1c</sub> (2,31). Poločas fruktózaminu je pouze 10 - 14 dní, zatímco u HbA<sub>1c</sub> je 6 týdnů. (44,60) V případě použití je nutno měření opakovat 1x měsíčně (zatímco měření HbA<sub>1c</sub> se doporučuje provádět 3 - 4x ročně).

Ketoaminy sérových proteinů (zejména pak albuminu) redukují v slabě alkalickém prostředí (pH 10,35) nitrotetrazoliovou modř (NTB) na formazany, jejichž množství se měří fotometricky.

Hodnota 285 μmol/l je považována za horní hranici referenčního intervalu.

Při stanovení interferuje kyselina askorbová, kyselina močová, bilirubin a methyldopa. (46) Snížená proteosyntéza v játrech a zvýšená renální clearance proteinů při zánětlivých chorobách působí sníženou koncentrací fruktózaminu v séru.

## 8.6. GLYKOSURIE = glukóza v moči

Glykosurie je výsledkem glomerulární filtrace většího množství glukózy, než ledvinné tubuly mohou absorbovat. Malé množství glukózy se dostane do moči u každého zdravého jedince (0,11 mmol/l). Termín glykosurie je používán pro patologicky zvýšené množství glukózy v moči. Abnormálně zvýšená glykosurie je výsledkem buď zvýšené hladiny glukózy v plazmě nebo snížené renální glukózové absorpční kapacity, popř. se mohou kombinovat obě poruchy. (33)

Za normálního stavu ledvinné tubuly reabsorbují téměř všechnu glukózu, která je filtrována v glomerulech. Většina přefiltrované glukózy se reabsorbuje ve stočeném proximálním ledvinném tubulu. (58) Při vzestupu hladiny glukózy v plazmě se zvyšuje filtrační nálož a renální tubulární reabsorpce glukózy stoupá lineárně až dosáhne hodnoty maximální resorpční kapacity. (27) Ta je 0,9 – 2,0 mmol/min a je konstantní pro každého jedince. (27)

Pokud je kapacita ledvinných tubulů pro reabsorpci glukózy porušena, může dojít ke glykosurii i při normální glykémii. Koncentrace glukózy v plazmě, která se projeví glykosurií se označuje jako „renální práh pro glukózu“. Ten se obvykle udává jako hladina glykémie 10 mmol/l po dobu 15 minut. Při posuzování výsledků je však nutné mít na paměti, že renální práh pro glukózu má značné interindividuální a intraindividuální kolísání (v krajních případech od 2, 8 do 19, 4 mmol/l). (33)

Věk, srdeční selhání, ledvinné onemocnění (např. diabetická glomeruloskleróza), a chronická hyperglykémie renální práh pro glukózu zvyšují. Těhotenství, hyperthyreoidismus, horečka a cvičení ho snižují. (55)

### **Role a význam**

Kvalitativní ani kvantitativní zkoušky průkazu či měření glukózy v moči nejsou řazeny mezi základní nástroje diagnózy diabetu ani sledování jeho stavu. (2,5,46,48)

Sledování glukózy v moči může sloužit pouze jako nedokonalá náhrada za sledování glukózy v krvi osobními glukometry, např. u pacientů, kteří nejsou schopni/ochotni dosáhnout akceptovatelné kvality práce s glukometrem. U diabetiků 2. typu (na inzulinu nezávislých - léčených dietou nebo dietou a PAD), kteří nemají možnost sledování cukru v krvi, je sledování glykosurie považováno za důležitou informaci, která může upozornit na možné zhoršení kompenzace cukrovky. Sledování cukru v moči testovacími proužky je doporučováno diabetikům 2. typu většinou 2-3 hodiny po jídle (možno měřit i nalačno

spolu s ketolátkami). Rozhodně se nelze podle močových nálezů orientovat v úpravách dávek inzulínu.(60,61)

### **Preanalytické podmínky**

Moč je vhodné odebírat do tmavé nádoby. Glukóza při sběru moče může být konzervována přidavkem 5 ml ledové kyseliny octové do nádoby před začátkem sběru. V močových vzorcích bez konzervace může obsah glukózy po 24 hodinách při pokojové teplotě klesnout až o 40%. Proto je vhodné uchovávat během sběru vzorky na ledu.(62)

Falešně negativní výsledky způsobují redukční látky (zejména pak kyselina askorbová), naopak falešně pozitivní výsledky dávají látky s oxidačními účinky (peroxidové látky, chlornany). (60,61)

### **Analytické podmínky**

Vyšetření moče je metoda jednoduchá a bezbolestná. Pro ekonomickou nenáročnost je preferována i ze strany zdravotních pojišťoven.

Materiál: glykosurii můžeme měřit ze středního proudu ranní moče, nebo častěji z moče sbírané. Sbírá se 24 hodin. Důležitý je záznam o množství nasbírané moči, který slouží pro přepočítání denních ztrát glukózy močí (fu-glu).

### Semikvantitativní stanovení diagnostickými proužky

Princip stanovení:

Většina technik pro měření glykosurie jsou založeny na oxidaci glukózy. Indikační proužek obsahuje enzym glukózaoxidázu v jejíž přítomnosti se glukóza oxiduje vzdušným kyslíkem na glukonolakton a zároveň vzniká peroxid vodíku. Peroxid vodíku oxiduje, za přítomnosti enzymu (křenové peroxidázy), chromogenní látku (ortotoluidin) na modrozelený nebo hnědočervený produkt. Míra zbarvení je hodnocena. (18)

Specifita: Glukózaoxidázová reakce je prakticky specifická pro glukózu (jiné cukry reagují mnohonásobně méně).(33)

### Kvantitativní stanovení

Pro kvantitativní zhodnocení je nutné použít příslušný analyzátor. Princip stanovení je stejný jako u stanovení glukózy v séru či plasmě. (62)

### Fyziologické hodnoty:

ranní moč	0.3-1.1 mmol/l
sbíraná moč za 24 hodin	0.3 - 0.96 mmol/l

Nález cukru v moči na rozdíl od ketolátek není alarmujícím ukazatelem. (62)

### Ztráty glukózy močí (fu-glu)

Tato hodnota se získává výpočtem podle vztahu:

$$\text{objem moči za 24 hodin (l)} * \text{glukóza v moči (mmol/l)}$$

## 8.7. KETONURIE = ketolátky v moči

Ketolátky jsou intermediární metabolity zahrnující acetoctovou kyselinu,  $\beta$ -hydroxymáselnou kyselinu a aceton. (33)

Za normálního stavu jsou kyselina acetoctová a  $\beta$ -hydroxymáselná přítomny v krvi a moči v ekvimolárních množstvích. Poměr mezi acetátem a  $\beta$ -hydroxybutyrátem (normálně 1: 3) je dán stavem oxidačně-redukčních reakcí v organismu. (6,60)

### **Význam a role**

Zvýšené vylučování ketolátek močí u diabetu indikuje začínající dekompenzaci pro nedostatečnou utilizaci glukózy (nedostatek inzulínu).

Ketolátky mají být stanovovány u všech diabetických pacientů s hodnotou glukózy nad 16,7 mmol/l a též při výskytu klinických symptomů diabetické ketoacidózy. (60)

### **Preanalytické podmínky**

Falešně pozitivní výsledky při stanovení v moči mohou být způsobeny:

- silným zbarvením vzorků
- některými léky (například inhibitory acetylcholinesterázy)
- poškozením proužků nevhodným zacházením (expozice ovzduším, teplotou a pod.)
- lačněním nebo sníženým kalorickým příjmem (redukční diety)
- těhotenstvím (u asi 30 % případů)



Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny:

- velmi nízkým pH moči
- vysokým příjmem kyseliny askorbové
- mikrobiálním rozkladem a následným únikem těkavého acetonu

### **Analytické podmínky**

V praxi jsou nejčastěji ketolátky hodnoceny v moči ( tzv. ketonurie) pomocí diagnostických proužků.

#### Princip diagnostických proužků:

Ketolátky (především acetocetová kyselina) tvoří s nitroprusidem v alkalickém prostředí za přítomnosti síranu amonného růžové až fialové zbarvení;  $\beta$  – hydroxymáselná kyselina tuto reakci nedává, aceton reaguje s mnohem menší intenzitou.

#### Citlivost a specifita:

Reakci je možno zachytit 0,45 mmol/l (50 mg/l) acetocetové kyseliny.

Reakce specifická pro ketoskupiny v enolové formě. Rušit může vyšší koncentrace fenylpyruvátu (při fenylketonurii), který dává oranžové zbarvení. Alkalické prostředí dává zbarvení s některými léky (laxancia obsahující fenolftalein) nebo diagnostiky (bromsulfoftalein), které reakci překrývá.

Fyziologické hodnoty ketonurie: do 0,19 mmol/l (20 mg/l).

Při diabetické ketoacidóze dochází ke tkáňové hypoxii, která vede ke zvýšení  $\beta$ -hydroxymáselné kyseliny. Proto má pro diagnostiku diabetické ketoacidózy mnohem větší význam stanovení  $\beta$ -hydroxymáselné kyseliny než klasické stanovení ketolátek standardními diagnostickými proužky.(6,60)

### **Stanovení kyseliny $\beta$ – hydroxymáselné**

Měření ketonémie, tedy kvantitativně přesné hodnoty  $\beta$ -hydroxybutyrátu v krvi se provádí pomocí testacích proužků na ketonometru. Pro finanční náročnost je doporučeno zatím jen u dětí, těhotných žen a při léčbě inzulinovou pumpou.

Měření se provádí alternativně v krvi, séru nebo plasmě. V případě použití plasmy používají různí výrobci různých antikoagulancií. V séru/plasmě je stabilita analytu 1 týden při 4° C a několik týdnů, skladuje-li se vzorek při -20° C. Validní data o analytických znacích metody a ukazatelích analytické kvality nejsou dosud k dispozici nebo jsou kontroverzní.(60)

## 8.8. ALBUMIN V MOČI

Denně proteče ledvinami 40 kg albuminu. Do moče se za fyziologického stavu vyloučí průměrně 10 mg albuminu za den. (28) Pokud diabetik vylučuje za 24 hodin 30–300 mg albuminu močí, hovoříme o mikroalbuminurii (Tab.10). Mikroalbuminurii lze požadovat za prokázanou, jestliže je překročení uvedených kritérií dosaženo ve dvou ze tří po sobě následujících vzorcích moči analyzovaných v intervalu 3-6 měsíců. (3) Potřeba zvýšeného počtu měření je dána vysokou hodnotou intraindividální biologické variace albuminu v moči.

### **Význam a role**

Měření koncentrace albuminu v moči diabetiků vykazuje významnou schopnost časně predikce diabetické nefropatie. Zvýšená koncentrace albuminu v moči je také významným rizikovým faktorem srdečních chorob. (64)

### **Preanalytické podmínky**

U diabetiků nevykazuje albumin v moči diurnální variabilitu. Vyšetření je nutné provádět za stabilizovaného klinického stavu. (24) Koncentraci albuminu v moči ovlivňuje dekompenzovaný diabetes, dekompenzovaná hypertenze, akutní chorobné stavy, infekce močových cest a zvýšená fyzická námaha. (60,24,43)

### **Analytické podmínky**

Jsou dva způsoby vyšetření mikroalbuminurie. Prvním způsobem je stanovení poměru albumin : kreatinin v ranní moči nebo v náhodném vzorku moče. Druhým způsobem je měření vyloučeného albuminu v mg/den nebo µg/min ve sbírané moči za 12 až 24 hodin (Tab.10).

První způsob vyšetření silně doporučuje již mnoho let ve svých guidelines Americká diabetologická asociace a také US National Kidney Foundation. Albumin i kreatinin jsou sloučeniny dobře rozpustné ve vodě a tedy i v moči. Díky této vlastnosti optimálně reagují na pitný režim pacienta (pokud pacient hodně pije, obě látky jsou ve stejném poměru naředěny, a obráceně, pokud pije málo). Také nebylo prokázáno, že by sbírání moče vedlo k většímu záchytu pozitivních pacientů. Sběr moče má navíc řadu nevýhod: délkou dispenzarizace klesá kvalita sběru moče, pacienti neměří objem moče přesně (odměrným

válcem), v močovém měchýři zůstává reziduum moče, které při sběru není započítáno, s rostoucí délkou života přibývá inkontinentních pacientů a vzrůstá riziko rozlití materiálu, například při měření objemu moče.

Národní doporučení dává přednost 2. rannímu vzorku moče nebo stanovení ve sběru moče získaném během nočního odpočinku. Vyšetření v moči sbírané za 24 hodin se v ČR nedoporučuje.

Albumin je v moči stabilní minimálně 1 týden při teplotě 4 - 20°C. Zatímco během skladování při -20°C lze pozorovat mírné snižování koncentrace albuminu v moči, při teplotě -70°C a nižší k poklesu koncentrace nedochází ani po 6 měsících uskladnění.

typ vzorku	mikroalbuminurie
sběr moči	30 – 299 mg/24hod
časovaný vzorek	20 – 199 µg/min
náhodný vzorek	2,8 – 28 mg/mmol kreatininu

Tab. 10. Kriteria detekce mikroalbuminurie

Hodnoty uvedených kritérií byly verifikovány a potvrzeny řadou studií. Klinická citlivost, zjištěná na bázi velké meta analytické studie (80), dosáhla hodnoty 91 %. Hodnoty přesahující horní intervaly uvedené v Tab. 10. jsou označovány jako **proteinurie**. Hodnocení proteinurie testovacími proužky je pro sledování diabetické neuropatie nedostačující. (2,3,34,46,64)

#### Principy metod:

Celosvětově se dnes stanovení albuminu v moči provádí imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky za použití polyklonální protilátky proti lidskému albuminu. Poslední dobou se ovšem ukazuje, že imunochemické metody hrubě podhodnocují koncentraci albuminu v moči. Příčinou je fragmentace albuminu v moči a ztráta části imunoreaktivity (nonimunoreaktivní albumin). Za spolehlivou metodu se považuje pouze HPLC, která dává o 20 – 30% vyšší výsledky. (16,24)

Dále jsou používány screeningové testovací proužky. Všechny takto vyšetřené pozitivní vzorky mají být verifikovány kvantitativní metodou. (64) Při pozitivitě celkového proteinu v moči diagnostickým proužkem se stanovení mikroalbuminurie neprovádí (je překročen pracovní rozsah měření).(43,60)

U diabetiků se doporučuje provádět vyšetření jednou ročně. Pozitivní výsledek je nutné potvrdit následným druhým, případně třetím měřením v intervalu 3 až 6 měsíců. (64)

## 8.9. AUTOPROTILÁTKY

Jak bylo uvedeno dříve, je DM 1. typu autoimunním onemocněním. V krvi těchto pacientů tedy můžeme stanovit řadu protilátek.

### Význam a role

Stanovení protilátek slouží k potvrzení diagnózy DM 1. typu a hodnocení stádia onemocnění.

V klinické praxi u dospělých diabetiků nejčastěji stanovujeme protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GADA - Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase). U člověka existují dvě izoformy tohoto enzymu - GAD65 a GAD67. Pro diabetes mellitus je relevantní pouze izoforma GAD65, proti níž jsou namířeny protilátky vyskytující se při inzulitidě. Výskyt protilátek proti GAD65 však není omezen pouze na diabetes, ale lze je nalézt také u tyreoiditid, adrenalitid a dalších onemocnění. Naopak další později objevené autoprotiilátky proti buňkám ostrůvků pankreatu 2 (IA2 - Islet Cell Antibodies 2) jsou vysoce specifické pro diabetes a u jiných autoimunních chorob se vyskytují podstatně méně než GADA.

Zcela výlučné postavení mají další protilátky-protilátky proti inzulinu (IAA - Inzulin Auto-Antibodies) pro specifitu inzulinu jako autoantigenu pro  $\beta$ -buňky pankreatu, zatímco všechny ostatní známé antigeny se vyskytují mimo  $\beta$ -buněk ještě v jiných tkáních. (48)

Jednotlivé protilátky se v krvi pacienta obvykle neobjevují zároveň, ale postupně. Jako první se u dospělých většinou vyskytují GADA, naopak u nejmladších dětí IAA. Objevivší se IA2 jsou patrně markrem rychlé progresy inzulitidy. ICA po nástupu klinických známek onemocnění, ve srovnání s výše uvedenými protilátkami, v krvi pacienta rychle klesají, což omezuje jejich využitelnost u pacientů s pomalejším průběhem onemocnění. V případě silných akutních zevních vlivů se však všechny protilátky mohou objevit i současně. Protilátky lze v krvi pacienta tedy detekovat již před klinickým nástupem DM, jelikož se začínají tvořit se začátkem procesu autoimunní inzulitidy. Jejich hodnota v průběhu onemocnění kolísá a s dovršením procesu destrukce  $\beta$ -buněk pankreatu dochází k jejich poklesu až vymizení. (32)

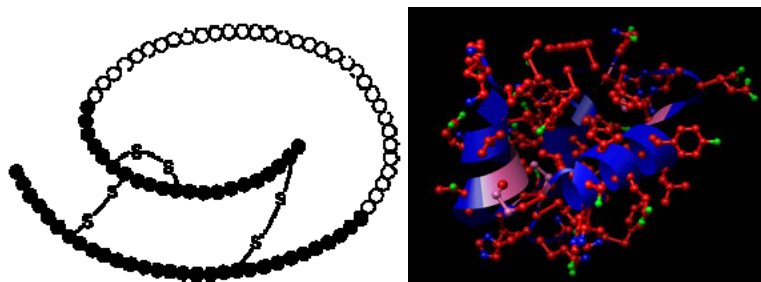
### Analytické podmínky

Autoprotilátky jsou nejčastěji stanovovány imunochemickou metodou ELISA. Vhodným materiálem je sérum získané centrifugací srážlivé krve.(54)

## 8.10. INZULÍN, C-PEPTID

### **Biosyntéza a sekrece inzulinu**

Inzulín je syntetizován v  $\beta$  - buňkách pankreatu ve formě tzv. proinzulinu, tj. prekurzoru inzulinu. Před sekrecí je proinzulín proteolyticky štěpen na dvou místech. Uvolní se tak vlastní inzulín (Obr. 4) a část, která původně spojovala oba polypeptidické řetězce inzulinu, tzn. C-peptid. Po odštěpení C-peptidu inzulín precipituje s ionty zinku za vzniku mikrokryсталů inzulinu, skladovaných v sekrečních granulích.



Obr.4. Stuktura inzulinu, podle Huang 1996 (25)

### Význam a role

Stanovení inzulinu a C-peptidu slouží k odlišení 1.a 2. typu diabetu a k monitorování produkce inzulinu u stavů využívajících podání exogenního inzulinu.

Jednorázové stanovení hladiny inzulinu nalačno nemá velkou diagnostickou cenu a proto se běžně neprovádí. U diabetiků léčených inzulinem dochází k interferenci s exogenním inzulinem a stanovení také ovlivňují eventuálně přítomné protilátky proti inzulinu.

Skutečnou endogenní sekreci inzulinu lépe odráží stanovení C-peptidu. V případě diabetu 1. typu jsou koncentrace C-peptidu nízké, na rozdíl od normálních (popř. zvýšených v důsledku IR) koncentrací v případě diabetu 2. typu. Kromě toho při stanovení C-peptidu neinterferuje exogenní inzulín.

### **Preanalytické podmínky**

Hodnocení hladin inzulínu i C-peptidu se nejčastěji provádí po provokaci glukózou. Příprava pacienta, dávka glukózy i časy odběrů jsou stejné jako u o-GTT. Provádí se 4-bodová (krev se odebírá ještě za 3 hod.) nebo 7-bodová zátěžová křivka. Můžeme provádět současně s vyšetřením glykemické zátěžové křivky.

Na vyšetření inzulínu (IRI = imunoreaktivní inzulin) a C-peptidu se odebírá srážlivá žilní krev (vyšetření ze séra).

Pro stanovení C-peptidu platí přísné preanalytické zásady: krev je nutno vložit do ledové tříště a ihned doručit do laboratoře. Lépe provádět odběry přímo v laboratoři.

Hodnotu koncentrace inzulínu a C-peptidu výrazně zkreslí případná hemolýza; je třeba dodržovat všechny zásady správného odběru a hemolýze se vyhnout. Vyšetření nelze hodnotit u nemocných s renální insuficiencí. (33,44)

Stanovení inzulínu ani C-peptidu nehraje významnou roli při rutinním sledování ani diagnostice u diabetických pacientů. (64)

### III. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo zhodnotit případnou vzájemnou závislost biochemických parametrů stanovovaných v rámci pravidelných kontrol u diabetiků 2. typu.

## IV. PRAKTICKÁ ČÁST

### 1. MATERIÁL A METODA

#### 1.1. Materiál

Krev byla odebrána do 2 typů zkumavek Vacuette (Dialab, Německo) podle typu stanovení: s antikoagulačním přípravkem K<sub>3</sub>EDTA pro změření glykovaného hemoglobinu a druhý typ bez antikoagulačního přípravku pro glykémii.

Reagencie potřebné pro stanovení glukózy (v séru i moči) a pro glykovaný hemoglobin byly zakoupeny od firmy Roche (Německo).

#### 1.2. Přístroj

Analyzátor Cobas integra 800 od firmy Roche (Německo) pracuje na čtyřech základních principech: absorpční fotometrie; fluorescenční polarimetre; turbidimetrie a potenciometre. Pro měření glukózy v séru i v moči byla použita enzymatická metoda s hexokinázou. Ztráty glukózy močí (fu-glu) je vypočítaná hodnota z glykosurie a objemu nasbírané moči za 24 hodin:  $fu-glu = \text{objem moče za 24 h (l)} * \text{glukóza v moči (mmol/l)}$ . Pro stanovení HbA<sub>1c</sub> byla použita imunochemická metoda založená na turbidimetrické inhibici v hemolyzované plné krvi.

#### 1.3. Pacienti

Data od 24 žen ve věku 50 – 86 let a 30 mužů ve věku 40 – 82 let trpících diabetem 2. typu byla získána z databáze laboratoře. Jedná se o pacienty pravidelně kontrolované v diabetologické poradně.

#### 1.4. Statistická analýza

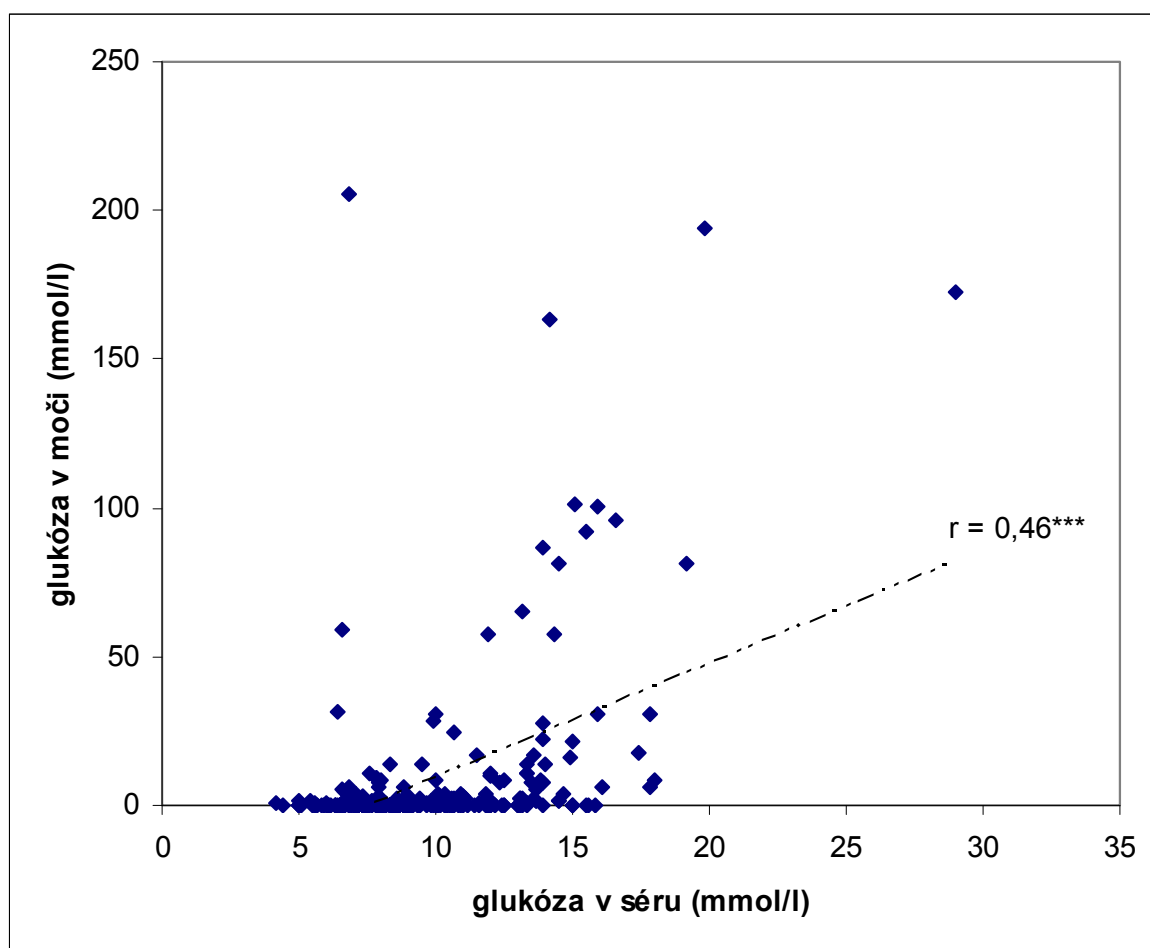
Pearsonův korelační koeficient byl stanoven za pomoci programu GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows, GraphPad Software (San Diego California USA). Za minimální hladinu statistické významnosti byla považována hodnota  $p < 0,05$ .



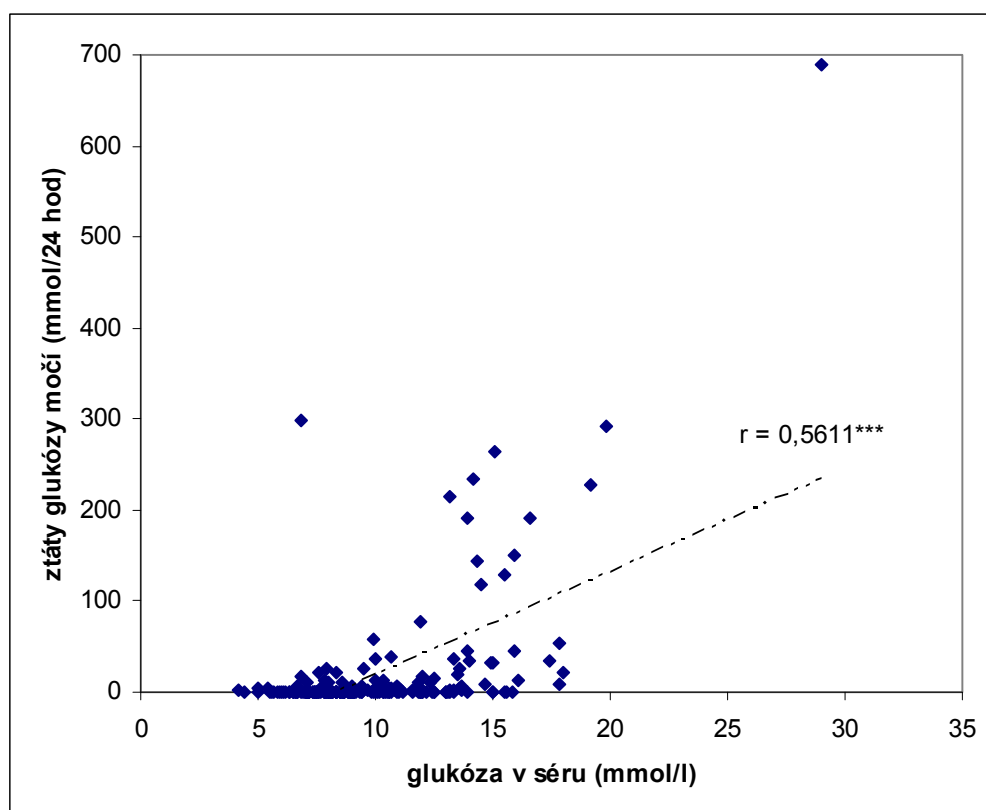
## 2. VÝSLEDKY

### 2.1. Vzájemné závislosti základních biochemických ukazatelů

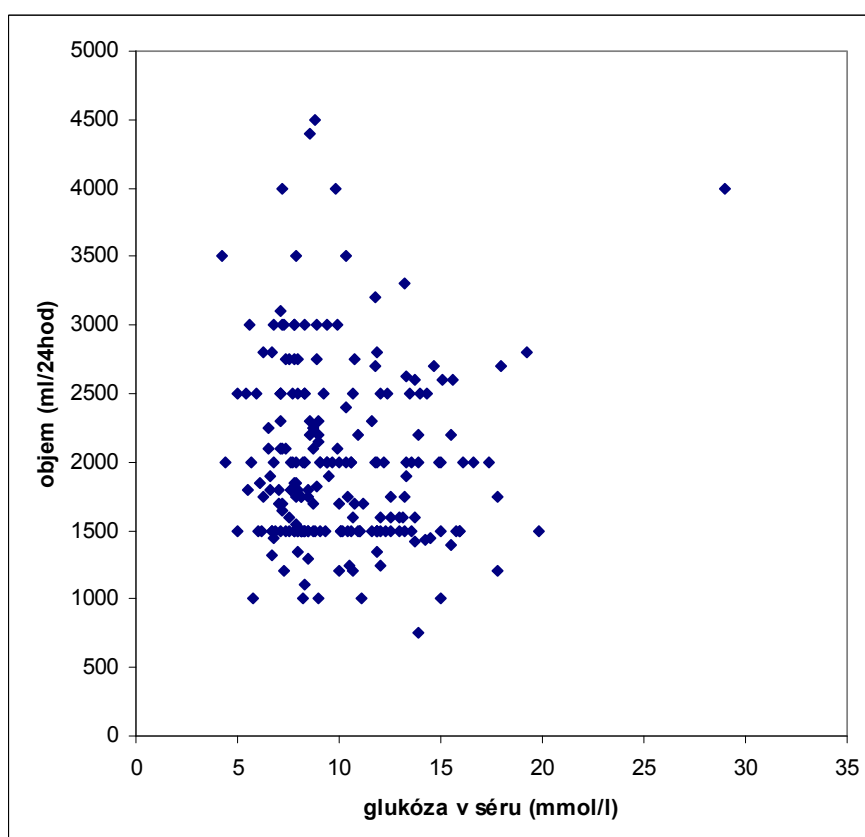
Nejdříve byly stanoveny korelační koeficienty mezi všemi měřenými veličinami (Obr.5-14). Vysoký korelační koeficient byl nalezen mezi glukózou v séru a glukózou v moči, glukózou v séru a ztrátami glukózy močí za 24 hodin, glukózou v moči a jejími ztrátami močí za 24 hodin a mezi glykovaným hemoglobinem a glukózou v séru (Obr. 5, 6, 8, 14). Naopak mezi glukózou v séru a objemem moče, objemem moče a glukózou v moči, objemem moče a ztrátami glukózy močí za 24 hodin, objemem moče a GHb, GHb a glukózou v moči, GHb a ztrátami glukózy močí za 24 hodin nebyla nalezena statisticky významná závislost (Obr. 7, 9, 10, 11, 12, 13).



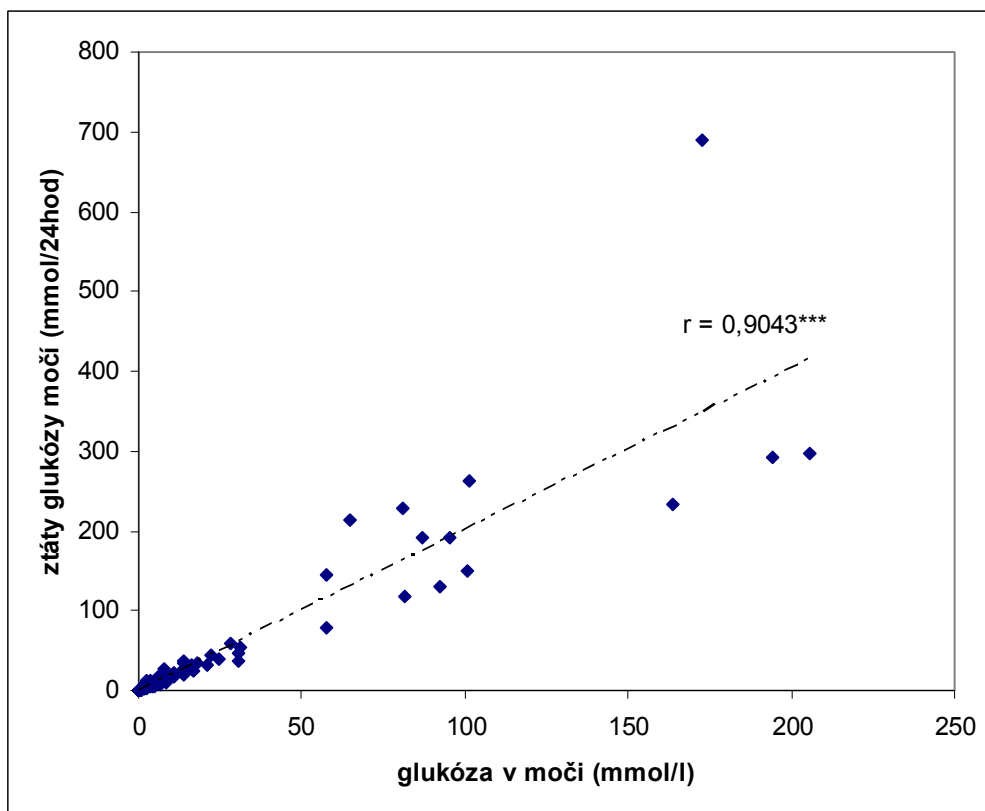
Obr.5 Závislost mezi glukózou v séru a glukózou v moči.



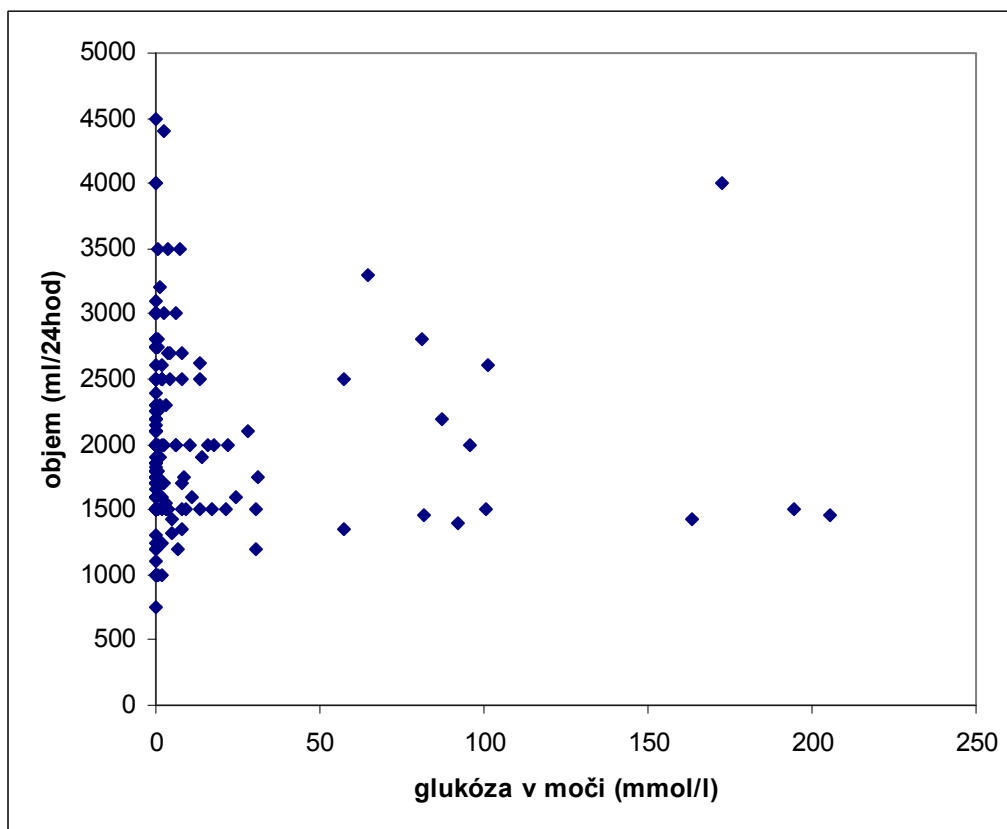
Obr.6 Závislost mezi glukózou v séru a ztrátami glukózy močí za 24 hodin.



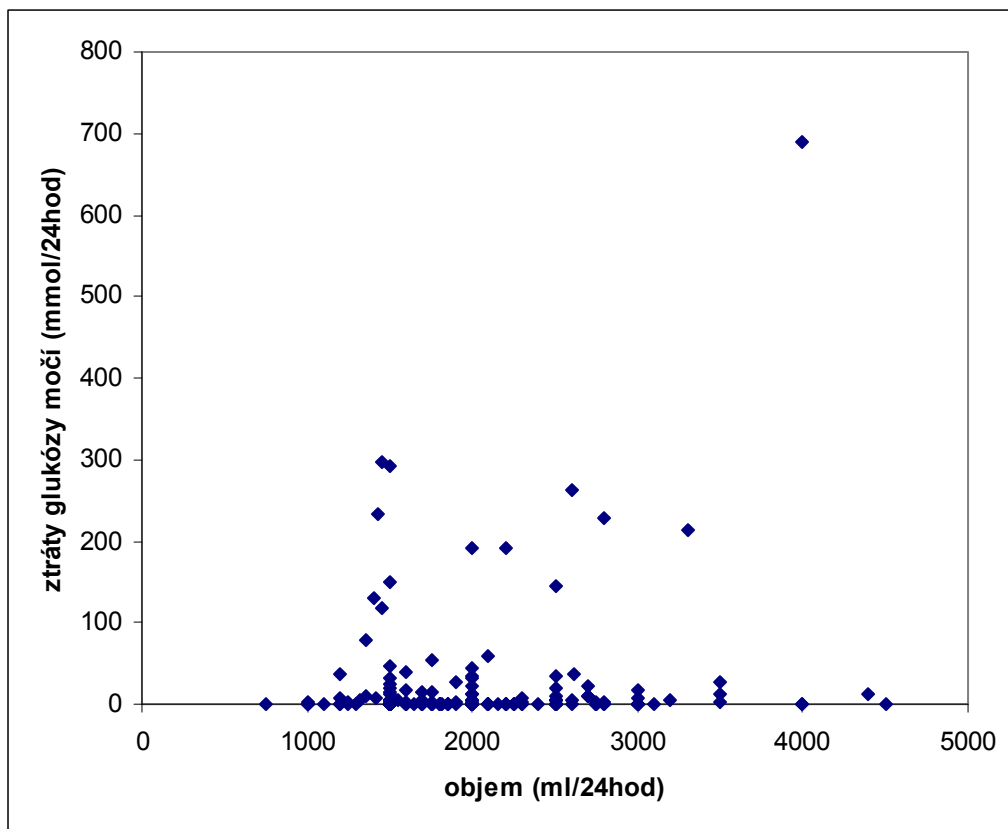
Obr.7 Vztah mezi glukózou v séru a objemem moče sbírané 24 hodin. Korelační koeficient byl nízký (-0,02) bez statistické významnosti..



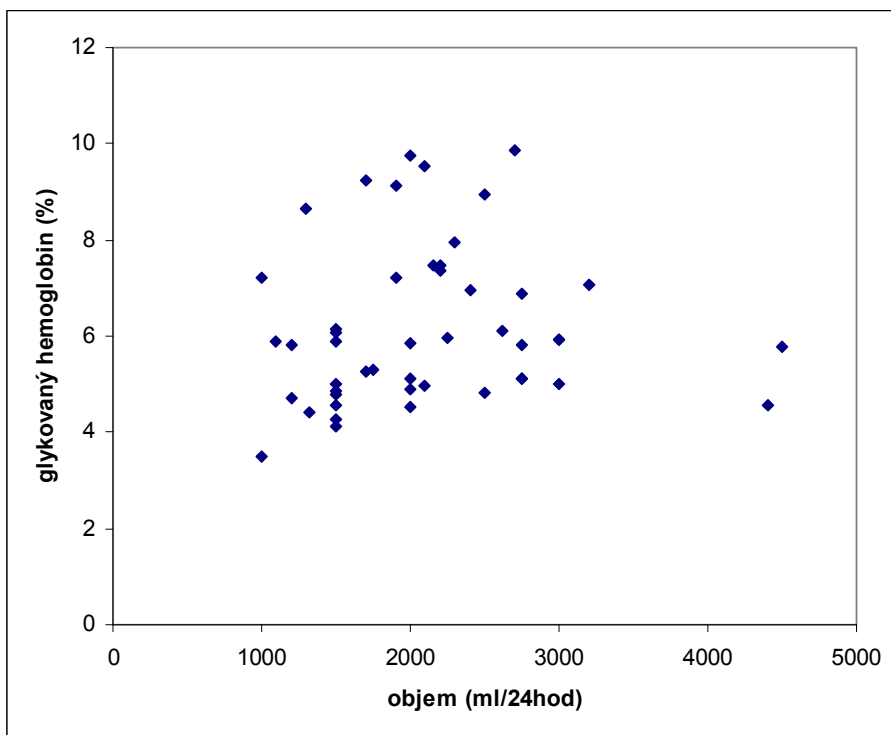
Obr.8 Závislost mezi glukózou naměřenou ve vzorku moči a ztrátami glukózy moči za 24 hodin.



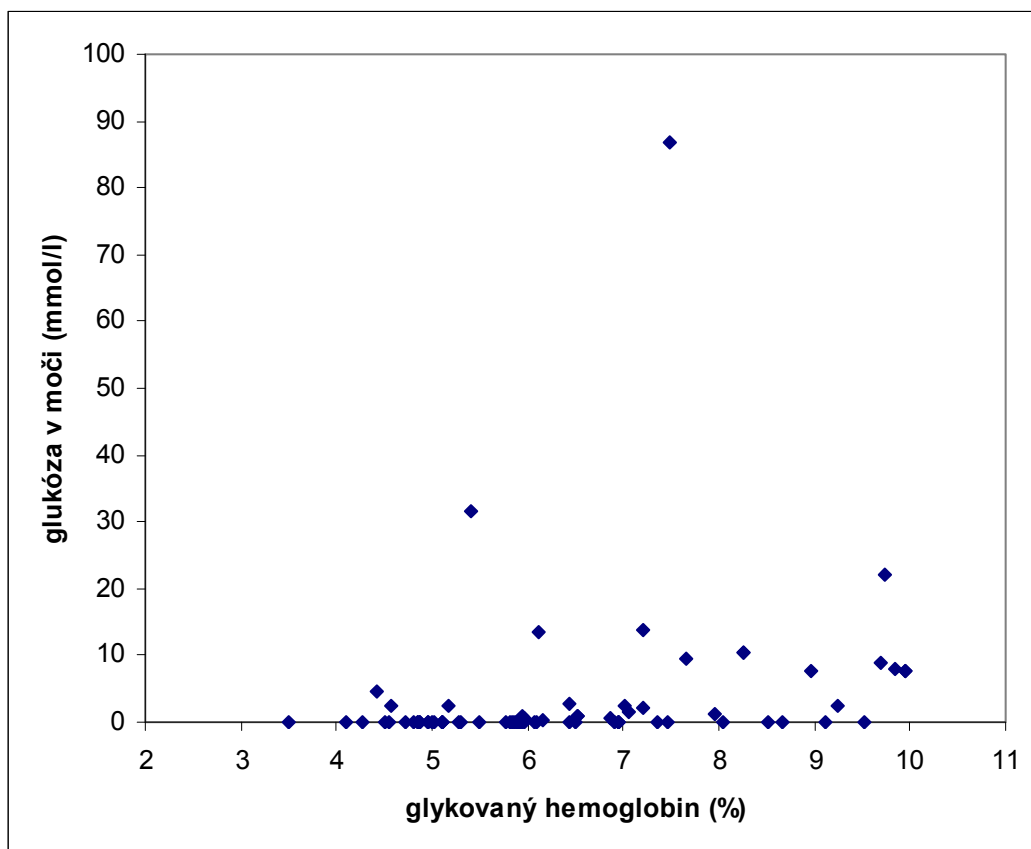
Obr.9 Vztah mezi glukózou v moči a objemem moče sbírané za 24 hodin. Korelační koeficient byl nízký (0,007) a nebyl statisticky významný.



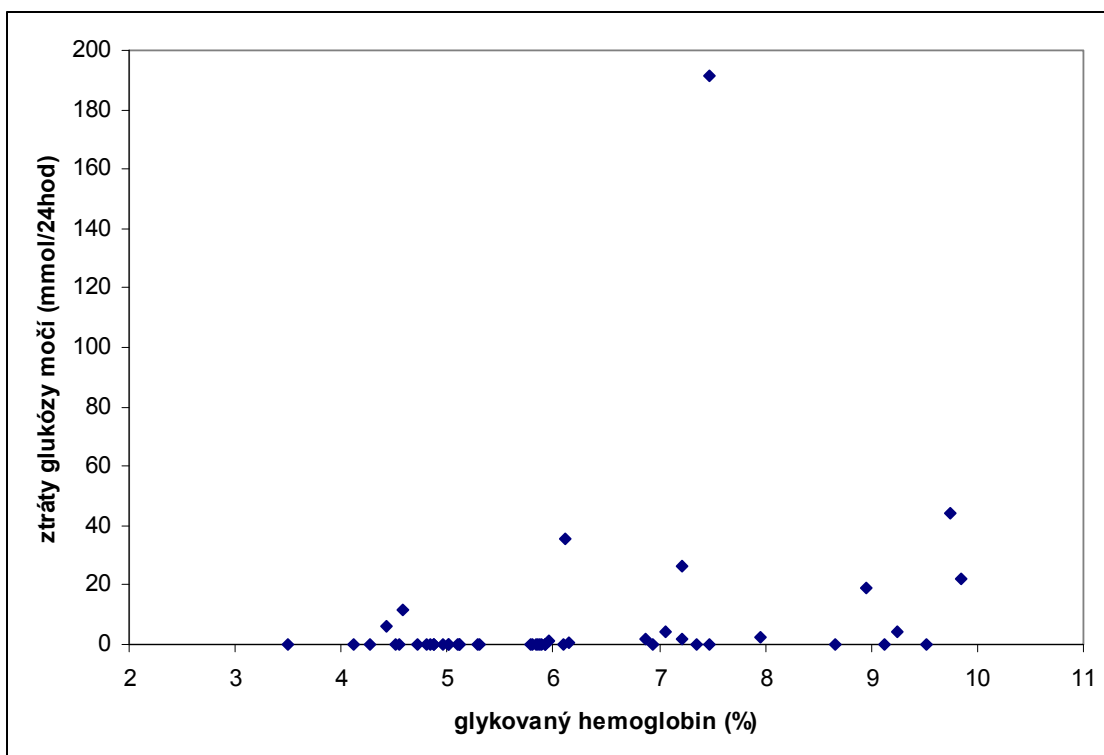
Obr.10 Vztah mezi objemem moče sbírané za 24 hodin a ztrátami glukózy močí. Korelační koeficient byl nízký (0,15) a statistická významnost malá (0,03).



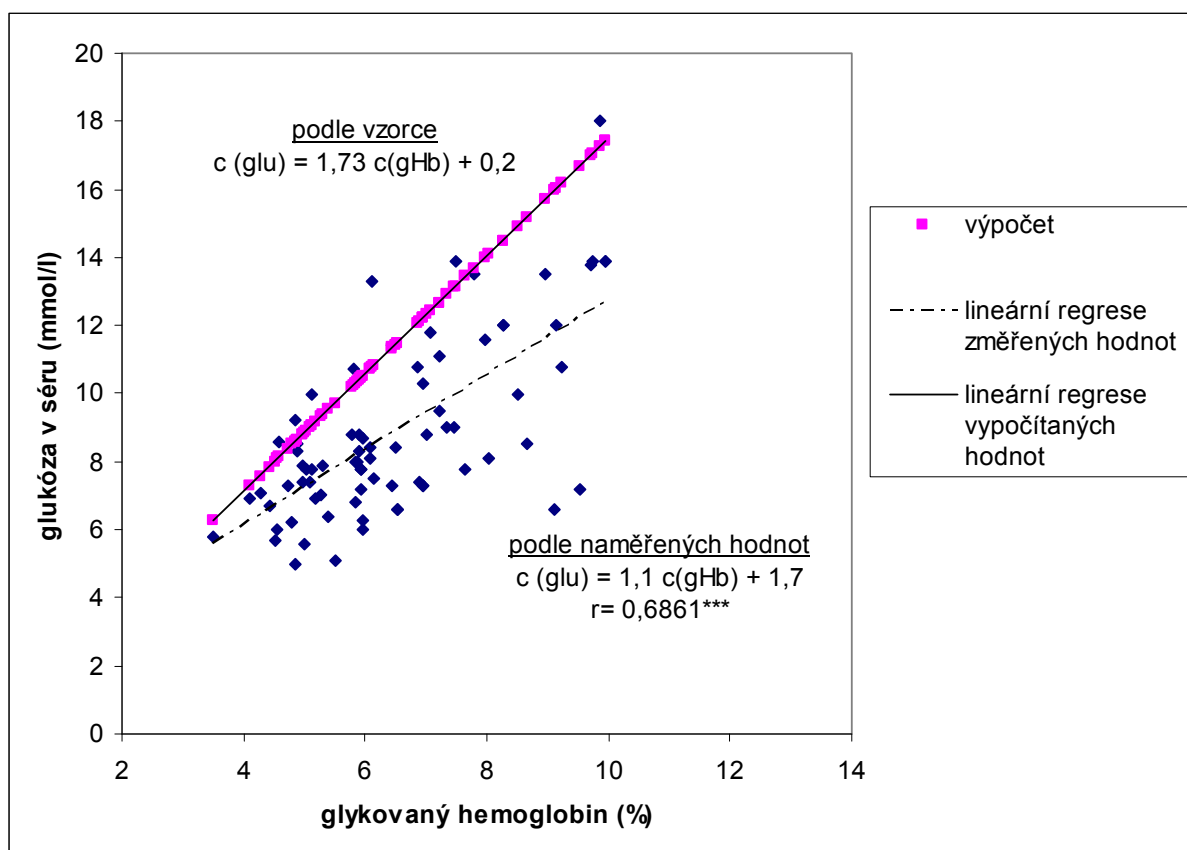
Obr.11 Vztah mezi objemem moče sbírané za 24 hodin a glykovaným hemoglobinem. Korelační koeficient byl nízký (0,085) a nebyl statisticky významný.



Obr. 12 Vztah mezi glykovaným hemoglobinem a glukózou v moči. Korelační koeficient byl nízký (0,24) a statistická významnost malá (0,04).



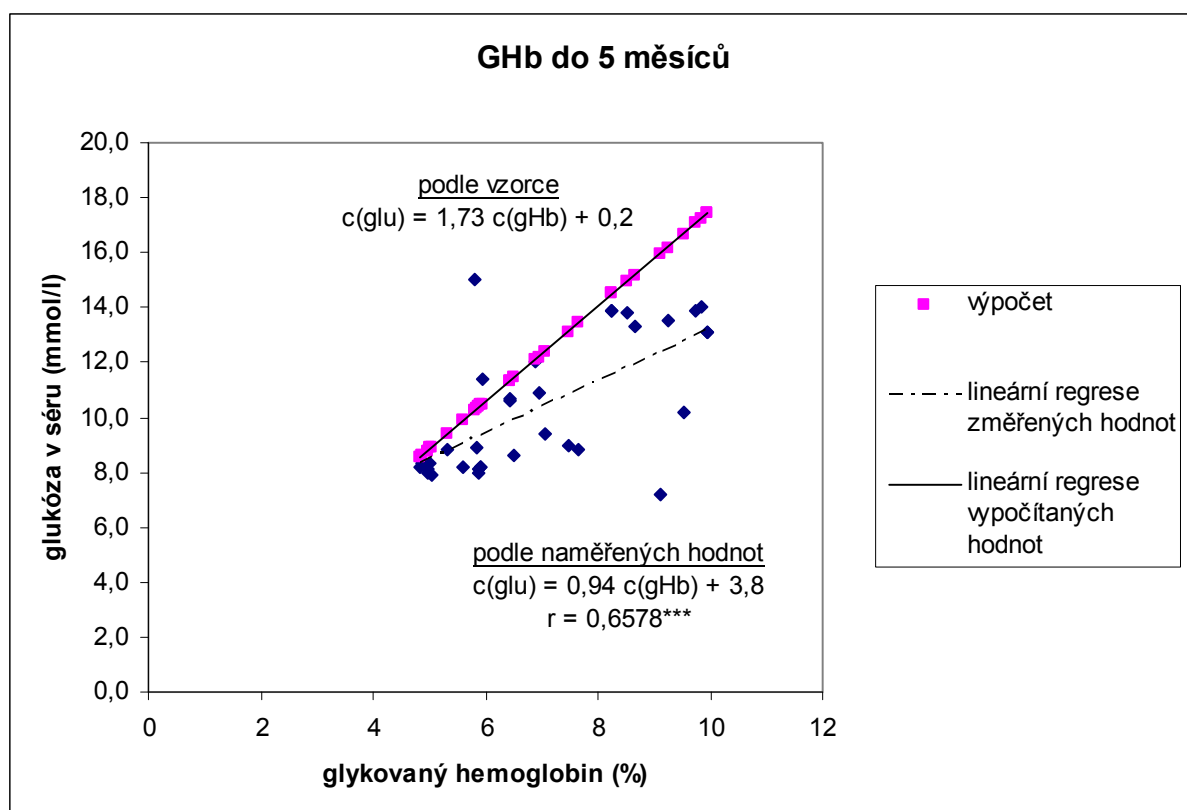
Obr.13 Vztah mezi glykovaným hemoglobinem a ztrátami glukózy moči za 24 hodin. Korelační koeficient byl nízký (0,25) a nebyl statisticky významný.



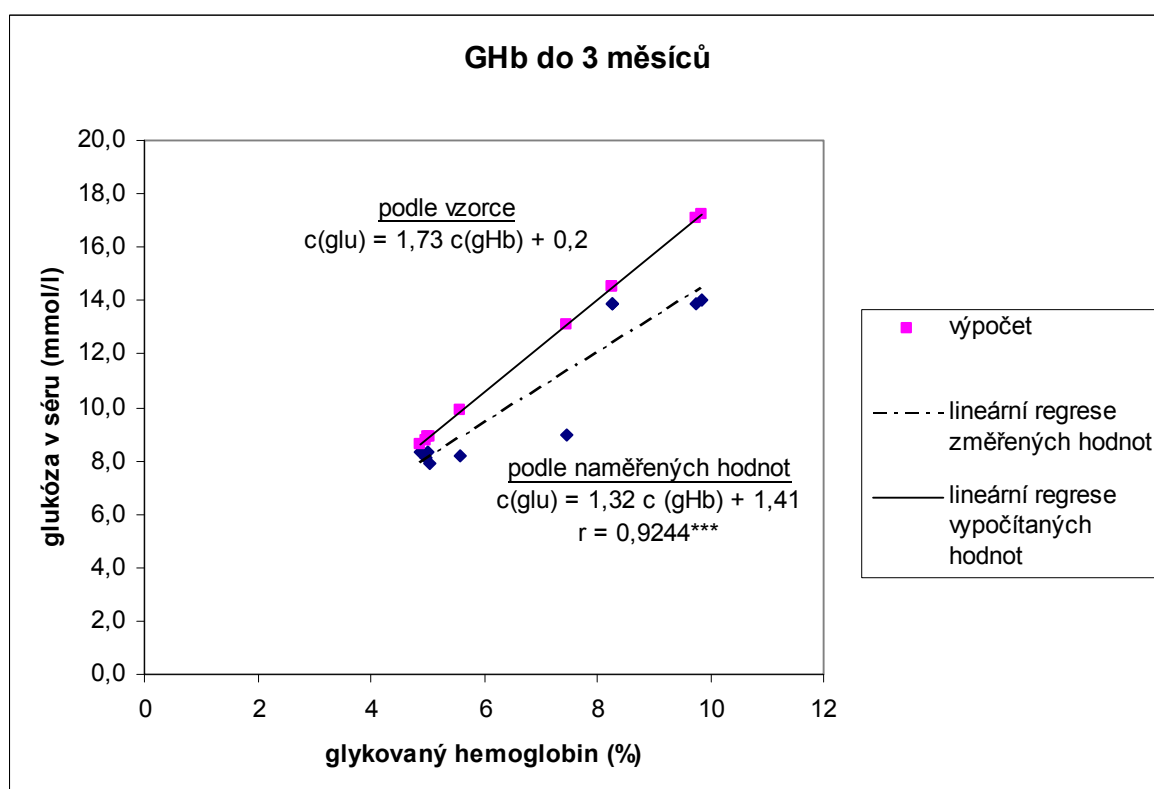
Obr.14 Závislost mezi glykovaným hemoglobinem a glukózou v séru. Porovnání hodnot glukózy v séru změřené a vypočítané ve vztahu ke glykovanému hemoglobinu (střední koncentrace glukózy (mmol/l) =  $1,73 \times \text{HbA}_{1\text{C}} + 0,20$  ).

## 2.2. Korelace GHb a glukózy v séru podle časového rozmezí

V této části byl sledován rozdíl mezi vzájemnou závislostí glykémie (glukózy v séru) a GHb měřeného v odlišných časových rozmezích. Byly zanalyzovány výsledky, kde byl GHb změřen do 3 měsíců (tj. do 90ti dnů) od měření příslušné glykémie a výsledky GHb změřeného do 5ti měsíců (tj. 150 dnů) od měření glykémie (Obr 15. a 16).



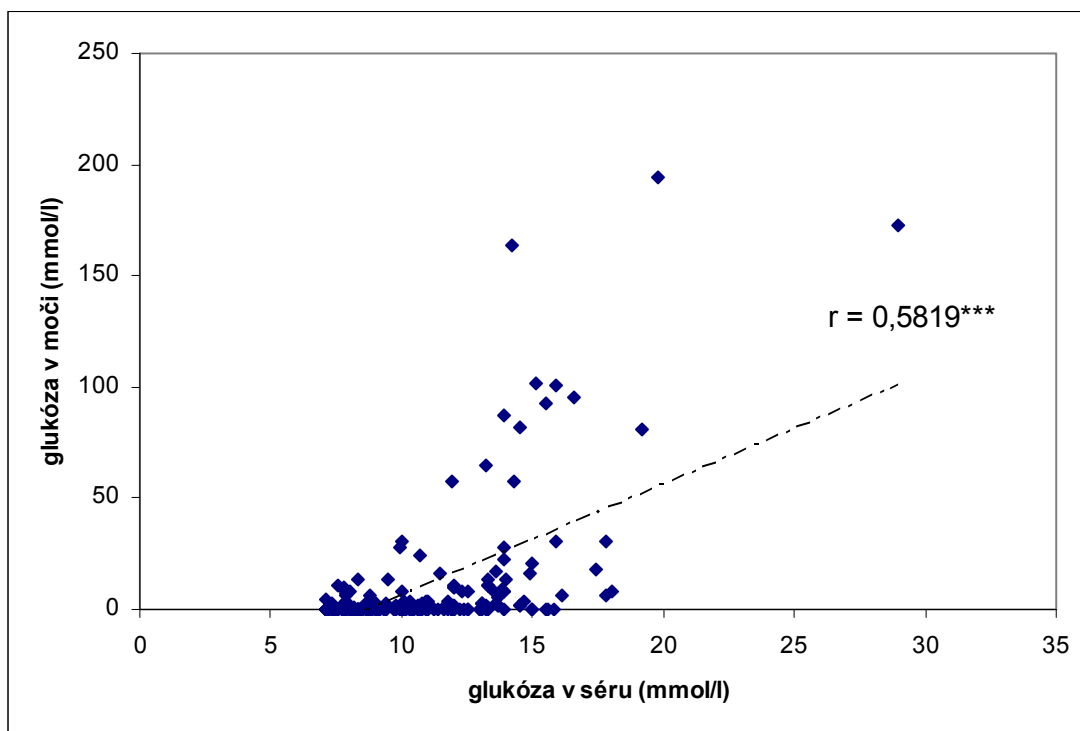
Obr.15 Závislost mezi glykovaným hemoglobinem změřeným do 5ti měsíců a glukózou v séru.



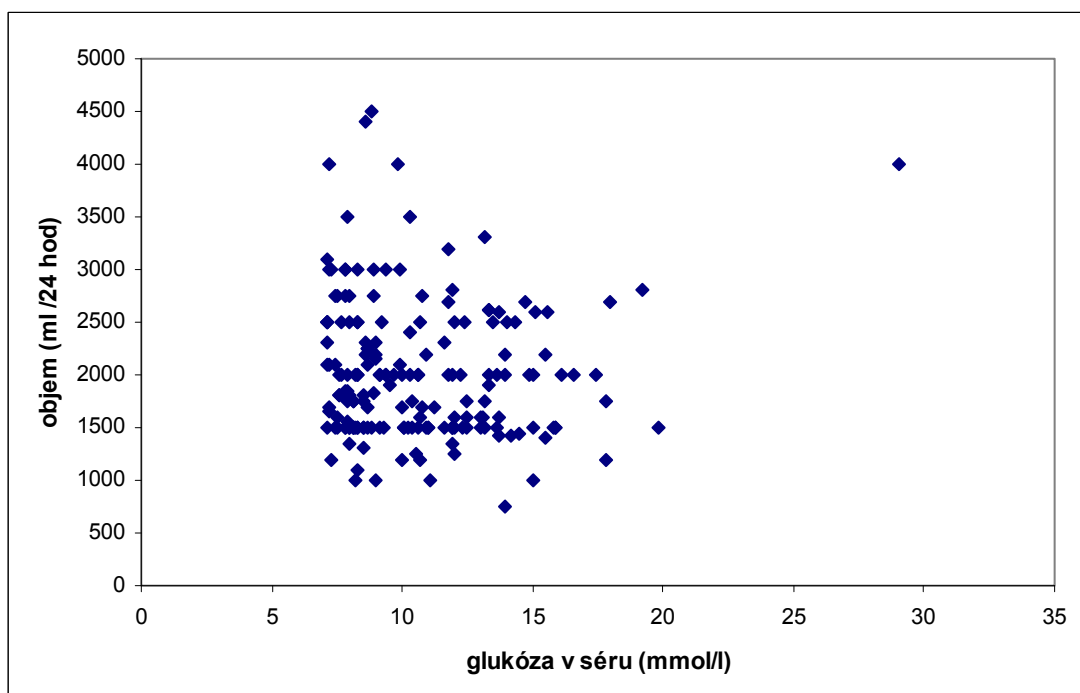
Obr.16 Závislost mezi glykovaným hemoglobinem změřeným do 3 měsíců a glukózou v séru.

### 2.3. Korelace u glykemií nad 7 mmol/l

V této části jsou zobrazeny závislosti jednotlivých biochemických ukazatelů ke glykemiím, které potvrzují diagnózu diabetu - tedy s hodnotami nad 7 mmol/l. (Obr.17 až 20).

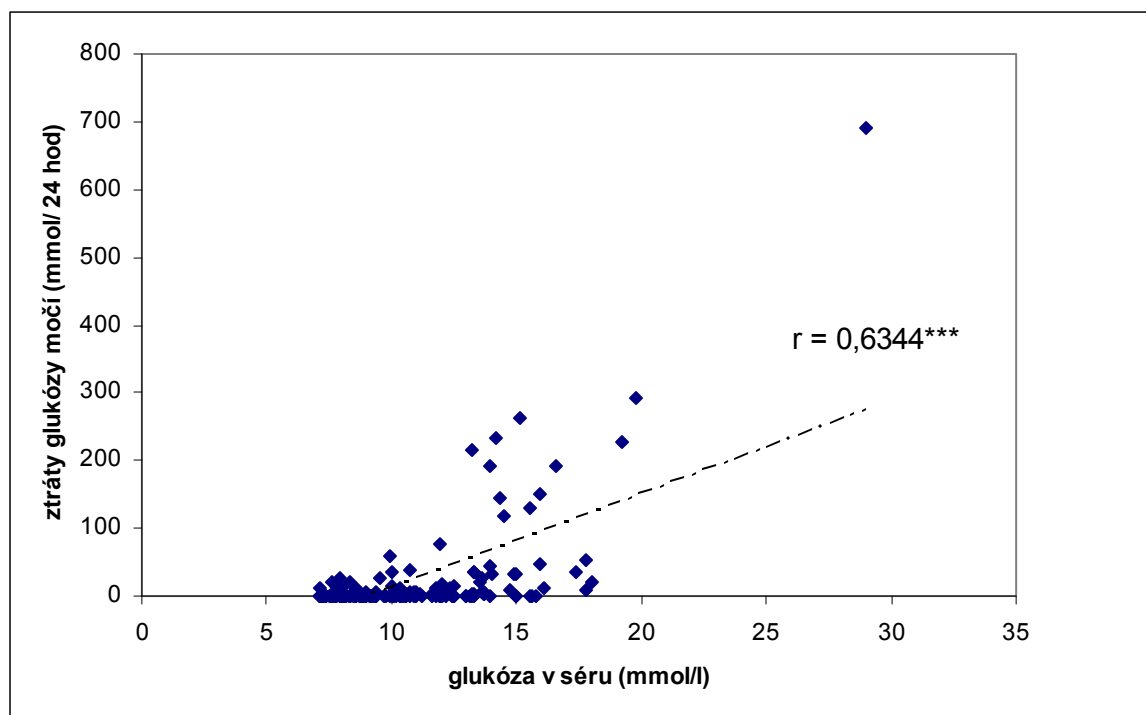


Obr.17 Závislost mezi glukózou v séru a glukózou v moči.

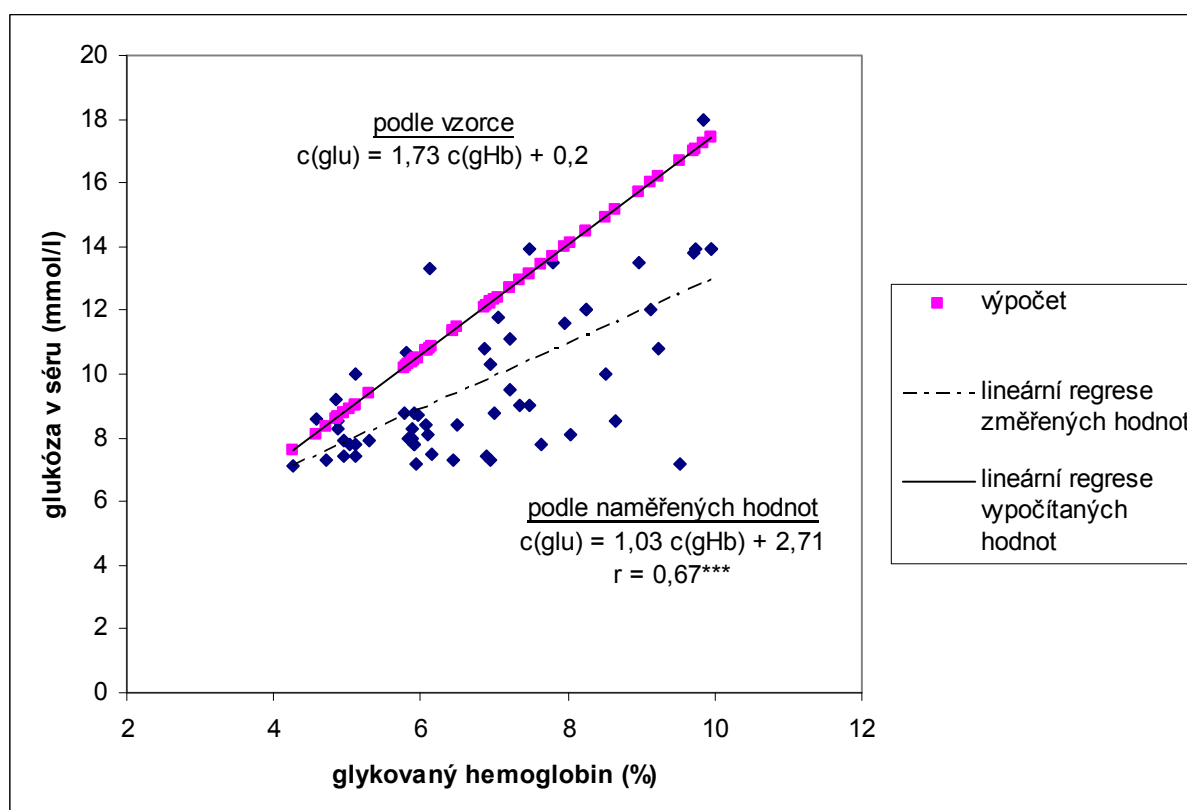


Obr.18 Vztah mezi glukózou v séru a objemem moče sbírané za 24 hodin. Korelační koeficient byl nízký (-0,008) bez statistické významnosti.





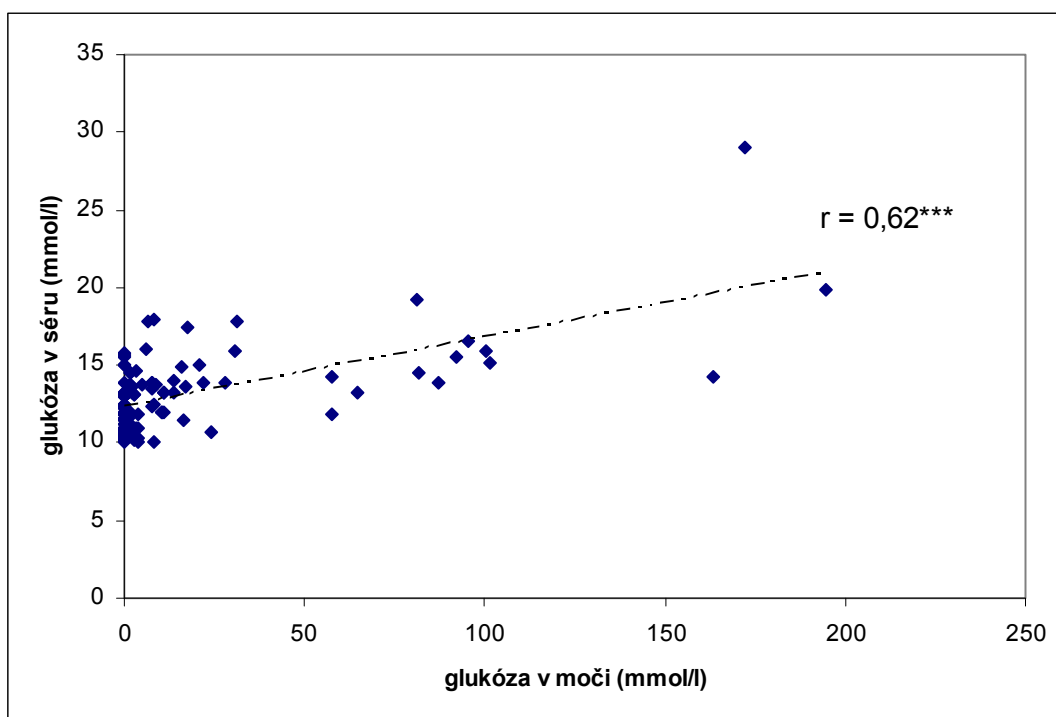
Obr.29 Závislost mezi glukózou v séru a ztrátami glukózy močí za 24 hodin.



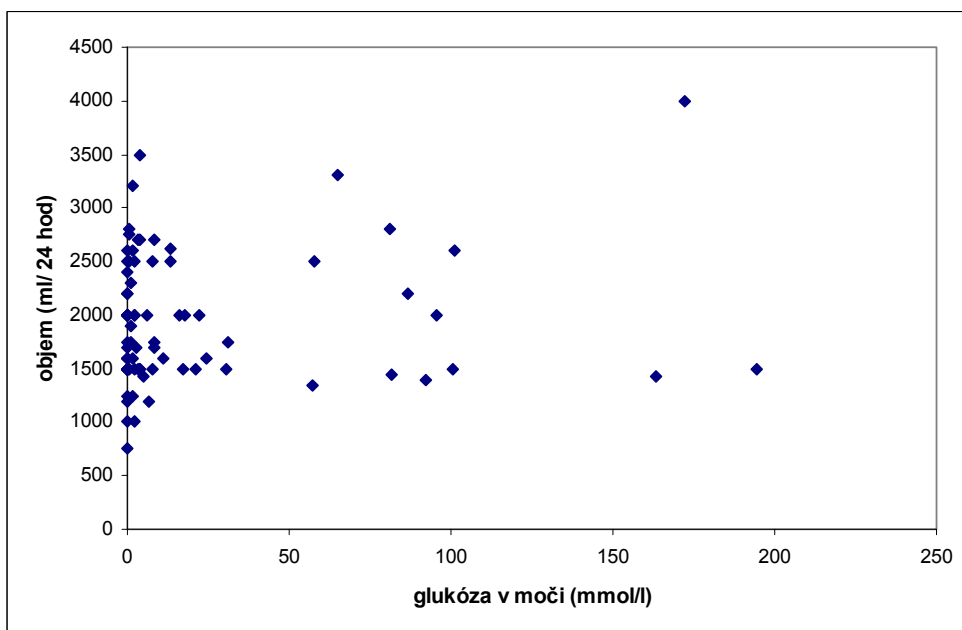
Obr.20 Závislost mezi glykovaným hemoglobinem a glukózou v séru.

## 2.4. Korelace glukózy v moči

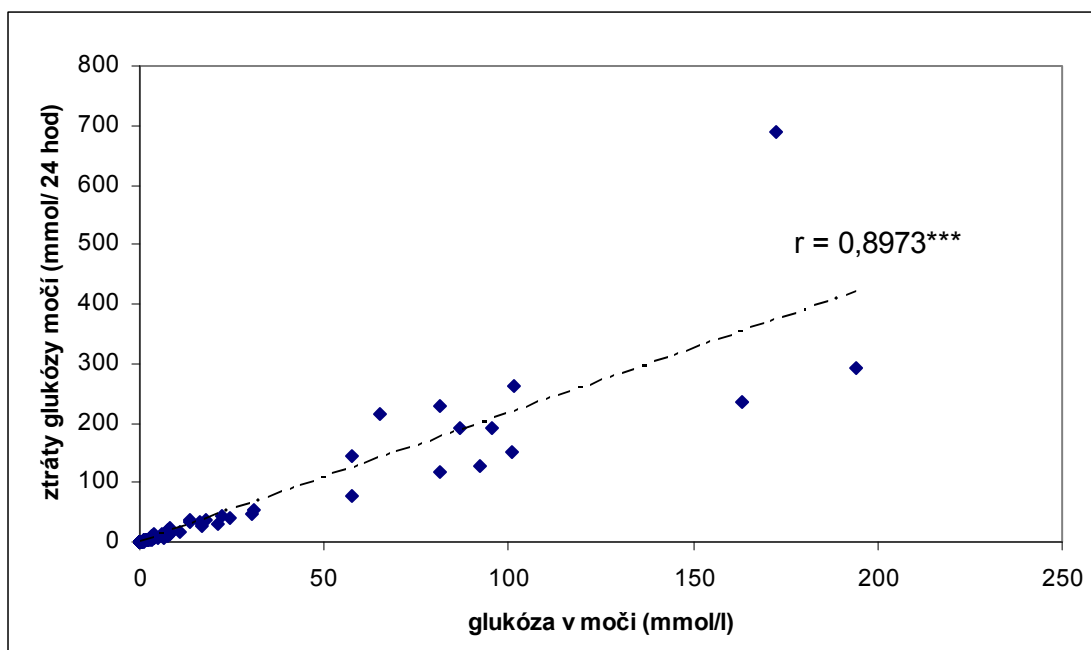
V poslední části jsou zobrazeny závislosti biochemických ukazatelů ve vztahu ke glukóze měřené v moči. Pro toto hodnocení byly použity vzorky s glykemií nad 10 mmol/l., neboť tato hodnota je nejčastěji uváděna v souvislosti s překročením renálního prahu pro glukózu a následnou glykosurií (Obr.21 až 24).



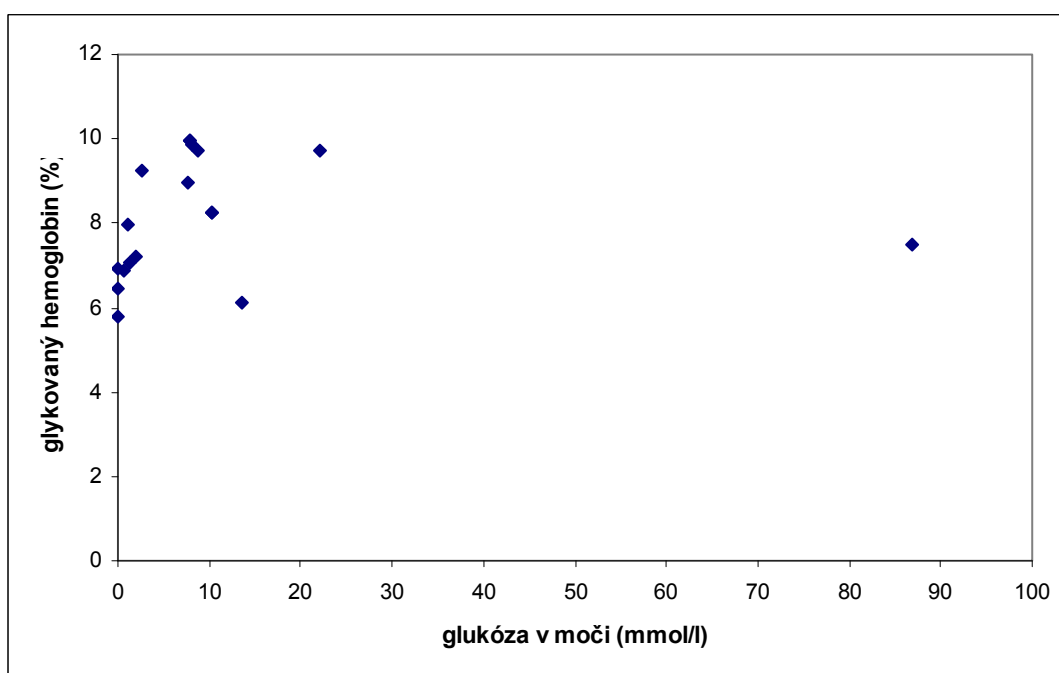
Obr.21 Závislost mezi glukózou v moči a glukózou v séru.



Obr. 22 Závislost mezi glukózou v moči a objemem moče sbírané za 24 hodin. Korelační koeficient byl nízký (0,16) a nebyl statisticky významný.



Obr.23 Závislost mezi glukózou v moči a ztrátami glukózy moči za 24 hodin.



Obr.24 Závislost mezi glukózou v moči a glykovaným hemoglobinem. Korelační koeficient byl nízký (0,05) a nebyl statisticky významný.

### 3. DISKUSE

Diagnóza a hodnocení léčby pacientů s DM se provádějí zejména hodnocením biochemických parametrů, ke kterým patří glukóza v séru (plazmě), glukóza v moči a glykovaný hemoglobin. Měření glykémie je vhodné k určení diagnózy a k posouzení aktuální hladiny glukózy v krvi, glykovaný hemoglobin se naopak využívá ke sledování dlouhodobé kompenzace pacienta a účinnosti léčby.

Výsledky získané v této studii ukazují na některé statisticky významné korelace mezi zmíněnými parametry. Nejvyšší korelační koeficient byl nalezen mezi glukózou měřenou v ranní moči a jejími ztrátami moči za 24 hodin. Zatěžovat pacienty celodenním sběrem moče pro měření glykosurie je tedy zbytečné. Skladování moče navíc vede k znehodnocení materiálu a zkreslení výsledků. Sbíraná moč by měla být konzervována přidávkou 5 ml ledové kyseliny octové do nádoby před začátkem sběru. V močových vzorcích bez konzervace může obsah glukózy po 24 hodinách při pokojové teplotě klesnout až o 40%. (62)

Statisticky významné korelace byly zjištěny také mezi glukózou v séru a glukózou v moči, či ztrátami glukózy moči za 24 hodin a mezi glukózou v séru a glykovaným hemoglobinem. Naopak objem moče nekoreloval s žádným ze zmíněných parametrů.

Zvyšující se glykémie zvyšuje korelaci mezi glukózou v séru a glukózou v moči. Toto zjištění není náhodné a odpovídá renálnímu prahu pro glukózu. Při glykémii pod 10 mmol/l nenacházíme v moči žádné nebo minimální hladiny glukózy. (64) Naopak z výsledků této studie lze usoudit, že při glykémii přes 10 mmol/l hladiny glukózy v moči lineárně stoupají právě v závislosti na glykémii. Při posuzování výsledků je však nutné mít na paměti, že renální práh pro glukózu má značné interindividuální a intraindividuální kolísání (v krajních případech od 2, 8 do 19, 4 mmol/l). Renální práh pro glukózu významně ovlivňuje také věk, těhotenství a řada onemocnění. (55)

Jak bylo uvedeno, glykémie nad 10 mmol/l je spojena se zvýšenou koncentrací vylučované glukózy v moči. Při zvýšené koncentraci glukózy v moči se předpokládá i zvýšené vylučování vody. Tyto ztráty vody asi nejsou v běžných případech příliš vysoké, jak ukázala naprostá absence statisticky významných korelací mezi objemem moče a měřenými parametry. Statisticky významný vztah mezi parametry glykémie a objemem moče by byl asi nalezen jen v případě hyperglykemického komatu, který je spojeno s dehydratací. (8)

Korelace mezi glykemií a GHb změřeným do 3 měsíců je lepší než u glykovaného hemoglobinu změřeného po 5ti měsících. Tyto výsledky potvrzují informace uváděné v literatuře.(70, 84) Glykace hemoglobinu a ostatních bílkovin je dlouhodobý děj závisící na glykémii. I mírně zvýšená glykémie přetrvávající delší dobu vede k zvýšení GHb, naopak krátkodobý výkyv glykémie hladinu GHb neovlivní. Konečné produkty glykace (AGE produkty) mají již zcela odlišné vlastnosti od původních bílkovin a jsou odpovědné za pozdní komplikace cukrovky.(44) V případě hemoglobinu dochází k rozpadu molekuly po 3 měsících od jejího vzniku. Měřením GHb lze získat zpětně informace o hodnotách glykemií za posledních 6 týdnů. To je doba, která odpovídá plazmatickému poločasu hemoglobinu.

Byly porovnány také výsledky glykemií získané měřením s vypočítanou hodnotou střední koncentrace glukózy v krvi ve vztahu ke GHb podle vzorce  $c(\text{glu}) = 1,73 \cdot c(\text{GHb}) + 0,20$ . Vypočítané hodnoty glykemií byly ve většině případů vyšší, než hodnoty glykemií získané měřením. Jak se dalo předpokládat, byly koncentrace GHb měřeného do 3 měsíců nejbližší vypočteným hodnotám. Podle literatury odpovídá každá změna hladiny HbA<sub>1C</sub> o 1 % změně střední koncentrace glukózy o 1,7 mmol/l (33), v naší studii byl naměřen rozdíl 1.3 mmol/l (při korelaci do 3 měsíců od změření glykémie). Je ale nutno dodat, že výsledky korelací mezi glukózou v séru a glykovaným hemoglobinem byly pravděpodobně zkresleny malým počtem vzorků.

## V. ZÁVĚR

Stanovení glykémie je základním ukazatelem pro určení diagnózy i sledování stavu diabetiků a její vyšetření je nezastupitelné a účelné. Tato DP v souladu s nálezy znovu poukázala na závislost mezi GHb a glykemií, která je vyšší při stanovení GHb po třech měsících od měření glykémie. Podobně byla potvrzena korelace mezi glykemií a glukózou v moči, která byla vyšší u vzorků s glykemií nad 10mmol/l, zdůrazňující tak na význam renálního prahu pro vylučování glukózy. Hlavním poznatkem vyplívajícím z této studie je fakt, že pro kvantitativní stanovení glukózy v moči plně postačuje jednorázový vzorek ranní moče a není tedy nutné pacienta zatěžovat celodenním sběrem moči.

## ABSTRAKT

Diabetes mellitus 2. typu je závažné a v naší populaci velmi časté civilizační onemocnění charakterizované zvýšenou glykemií v krvi (hyperglykemií) a přítomností dalších metabolických abnormalit. K diagnostice onemocnění se využívá stanovení glykémie v plazmě (séru). Ukazatelem dlouhodobé kompenzace diabetu je glykovaný hemoglobin.

V této práci byly sledovány případné závislosti mezi biochemickými ukazateli běžně stanovovanými u diabetických pacientů. Byla zpětně vyhodnocena data od 54 diabetických pacientů ve věku od 40 – 82 let pravidelně kontrolovaných v diabetické poradně. Vzorky byly analyzovány na Analyzátoru Cobas integra 800 od firmy Roche (Německo). Pro měření glukózy v séru i v moči byla použita enzymatická metoda s hexokinázou a pro stanovení HbA<sub>1c</sub> imunochemická metoda založená na turbidimetrické inhibici v hemolyzované plné krvi. Pro zhodnocení závislostí mezi veličinami byl použit Pearsonův korelační koeficient.

Nejvyšší korelační koeficient byl nalezen mezi glukózou měřenou v ranní moči a jejími ztrátami moči za 24 hodin. Statisticky významné korelace byly zjištěny také mezi glukózou v séru a glukózou v moči, či ztrátami glukózy moči za 24 hodin a mezi glukózou v séru a glykovaným hemoglobinem. Byla stanovena lineární závislost mezi glykemií a glykovaným hemoglobinem. Asi vzhledem k relativně nízkému počtu vzorků nebyla tato závislost zcela v souladu s literárními údaji. Podle předpokladu byla tato závislost nejbližší v případě lineární regrese mezi akutní glykemií a hodnotami glykovaného hemoglobinu měřeného v období zhruba 3 měsíce předem. Objem sbírané moče nekoreloval s žádným ze sledovaných biochemických parametrů. Korelace nebyla prokázána ani mezi glykovaným hemoglobinem a glukózou v moči, či ztrátami glukózy moči za 24 hodin.

Výsledky této práce potvrdily závislost mezi GHb a glykemií, která je vyšší při stanovení GHb po třech měsících od měření glykémie. Podobně byla potvrzena korelace mezi glykemií a glukózou v moči, která byla vyšší u vzorků s glykemií nad 10mmol/l, zdůrazňující tak na význam renálního prahu pro vylučování glukózy. Hlavním poznatkem vyplívajícím z této studie je fakt, že pro kvantitativní stanovení glukózy v moči plně postačuje jednorázový vzorek ranní moče.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus 2nd type is heavy and very frequent civilizing disease in our population. The disease is characterized by hyperglycemia and other metabolism abnormalities are present. Assessment of glycemia in plasma (serum) is used for a diagnostics of the disease. Indicator of long-term compensation of diabetes is glycosylated haemoglobin.

There were monitored possible dependencies between biochemical indicators in this work that are assessed to diabetic patients commonly. The data were analysed from 54 diabetic patients between the ages of 40 to 82 who visit a diabetic clinic periodically. The samples were analyzed by Cobas Integra 800 analyzer by Roche (Germany). Glucose in serum and in urine was analyzed by enzymatic method with hexokinase and glycosylated haemoglobin was analyzed by immunochemical method based on turbidimetric inhibition in haemolysed blood. Pearson's correlation coefficient was used for appreciation of dependencies between variables.

The highest correlation coefficient was found between glucose measured in morning urine and glucosidic losses by urine for 24 hours. Statistically important correlation were also found between glucose in serum and in urine or glucosidic losses by urine for 24 hours and between glucose in serum and glycosylated haemoglobin. Because of relatively few samples this dependence wasn't fully in keeping with literature data. According to premise the dependence was closest in the case of linear regression between acute glycemia and the values of glycosylated haemoglobin which was measured approximately 3 months before. The volume of collected urine not correlate with no monitored biochemical parameter. Correlation wasn't prove between glycosylated haemoglobin and glucose in urine or glucosidic losses by urine for 24 hours.

The results of this work confirm dependence between glycosylated haemoglobin and glycemia, which is higher in assessment of glycosylated hemoglobin after 3 months from measuring of glucose. Correlation was also confirmed between glycemia and glucose in urine, which was higher when glycemia was over 10 mmol/l which is a renal threshold for excretion of glucose. The main piece of knowledge resulting of this study is the fact that for quantitative analysis of glucose in urine is fully sufficient one-shot sample of morning urine.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADA	Americká diabetologická společnost
ADP	adenozindifosfát
AGE produkty	advanced glycosylation end products, konečné produkty glykosylace
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
ATP	adenozintrifosfát
AST	aspartátaminotransferáza
Ca	vápník
Cl	chloridy
ČDS	Česká diabetologická společnost
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	Diabetes mellitus
DOF hemoglobin	N-(1-deoxyfrokto-1-yl) hemoglobin beta
DPP4	dipeptidyl peptidáza 4
EASD	Evropská asociace pro studium diabetu
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	heterogenní enzymimunoanalýza
FPG	glykémie nalačno
fu-glu	ztráty glukózy močí
GADA	protilátky proti glutamátdekarboxyláze
GCI	glykemický kontrolní index
GDM	gestační diabetes mellitus
GHb	glykovaný hemoglobin
GLP-1	glukagon-like peptid 1
GLUT-protein	membránový proteinový přenašeč pro glukózu
GMT	glutamyltransferáza
GOD	glukózaoxidáza
G6PD	glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
HbA1c	frakce glykovaného hemoglobinu
HDL	cholesterol o vysoké hustotě

HGL	hraniční glukóza nalačno
HK	hexokináza
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IA2	protilátky proti tyrozinofosfatáze
IAA	protilátky proti inzulínu
ICA	protilátky proti Langerhansovým ostrůvkům
IDF	Mezinárodní federace pro diabetes
IFCC	Mezinárodní federace pro klinickou chemii a laboratorní medicínu
IFG	porušená glykémie nalačno
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IR	inzulínová rezistence
IRI	imunoreaktivní inzulín
K	draslík
LADA	Latent autoimmune diabetes in adults
LDL	cholesterol o nízké hustotě
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
Na	sodík
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NTB	nitrotetrazoliová modř
oGTT	orální glukózový toleranční test
PAD	perorální antidiabetika
PGT	porušená glukózová tolerance
POD	peroxidáza
PPG	postprandiální glykémie
RIA	radioimunoanalýza
TBC	tuberkulóza
TSH	thyreotropin
WHO	Světová zdravotnická organizace

## LITERÁRNÍ ODKAZY

1. ADVANCE Collaborative Group, Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358:2560-72
2. American Diabetes Association, Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* 2003; 36, Suppl 1: 1-56
3. American Diabetes Association, Diabetes Nephropathy. *Diabetes Care* 1999;22, Suppl 1: 66-69
4. American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28: 37-42
5. American Diabetes Association, Report of the Expert Committees on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2002;25,Suppl 1: 6-20
6. American Diabetes Association, Test of glycemia(Position Statement). *Diabetes Care* 2000; 23,Suppl 1:80-82
7. Anděl M. a kol, Diabetes mellitus a poruchy metabolismu. Galén, Praha 2001; 64-67
8. Anděl M.,Gregor P,Horák J, Kment M., Widimský P, Vnitřní lékařství V.Karolinum Praha 1996;97-121
9. Anděl M, Novák J, Kučera P, Březina J, Romanová H, Psottová J, Kadlec M, Vícha T, Trešlová L, Perušičová J, Potočková J, Diabetes mellitus 1. typu manifestovaný ve vyšším věku, tzv. LADA (latent autoimmune diabetes in adults) typ diabetu. *DMEV* 2001; 4: 158-171.
10. Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, et al., Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:2632–37.
11. Brunerová L, Brož J, Průhová Š, Lebl J, Anděl M, Maturity-onset diabetes of the young 3. *DMEV* 2002; 53 -57
12. Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM, The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978;200:21-27
13. Butier AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al, Mechanism of reduction of betacell. *Diabetes* 2003;52:102–10.
14. Cínek O, Koloušková S, Pechová M, Šumník Z, Sedláková P, Bendukidze N, Ivašková E, Šnajderová M, Vavřínek J, Predikce inzulin dependentního diabetes mellitus

- u dětských prvostupňových příbuzných diabetických pacientů. Časopis lékařů českých 2001;140 : 492-496.
- 15.Cinek O, Pechová M, Koloušková S, Horká I, Sedláková P, Šumník Z, Šnajderová M, Vavřínek J, Autoproti látky proti GAD65, IA2 a inzulinu u českých dětí při manifestaci diabetu 1. typu. Časopis lékařů českých 2000; 139: 599-603.
  - 16.Comper WD, Jerums O, Osicka TM, Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. Clin Biochem 2004;37:105111
  - 17.DeFronzo RA, Ratner RE, Han K, et al, Effects of exenatide on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin treated patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 2005;28:1092–1100.
  - 18.Feldman JM, Lebovitz FL, Tests for glucosuria : An analysis of factors that cause misleading results. Diabetes 1973;22:115-21
  - 19.Fluckiger R, Mortensen HB, Review:glycated haemoglobins. J.Chromatogr 1988;429:279-292
  - 20.Froguel P, Vaxillaire M, Velho G, Genetic and metabolic heterogeneity of maturity onset diabetes of the young. Diabetes Reviews 1997;5:123-130.
  - 21.Goldstein BJ, Feinglos MN, Luncford JK, et al, Sitagliptin 036 Study Group. Effect of initial combination therapy with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, and metformin on glycemic control in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 2007;30:1979–87
  - 22.Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM, Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 1995;18:896-909
  - 23.Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM, Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. Clin Chem 1986;32:B64-B70
  - 24.Gross L, Azevedo M, Silveiro S et al, Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention and Treatment. Diabetes Care 2005;28:164–176
  - 25.Huang C.C, Couch G.S, Pettersen E.F, Ferrin T.E, Chimera: An Extensible Molecular Modeling Application Constructed Using Standard Components. Pacific Symposium on Biocomputing 1996;1:724
  - 26.Chromý V, Fischer J, Havel J, Votava M, Bioanalytika, analytická chemie v laboratorní medicíně. Masarykova univerzita v Brně 2002: 2250 – 225
  - 27.Johansen K, Svendsen PA, Lorup B, Variations in renal threshold for glucose in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1984;26:180-182

28. Kaňková K, Molekulární patofyziologie pozdních komplikací diabetes mellitus – genetická predispozice k rozvoji diabetických komplikací. Vnitřní Lékařství 2005; 4: 438–449
29. Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, et al, Effects of exenatide on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. Diabetes Care 2005; 28:1083–1091
30. Klener P a kol, Vnitřní lékařství díl IV. Praha 1999; 182-193
31. Martina WV, Martijn EG, van der Molen M, Schermer JG, Muskiet FAJ,  $\beta$  - N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age. Clinical Chemistry 1993;39:1717-1723
32. Martinka E, Úskalia klasifikácie diabetes mellitus. Lufema, Bratislava 1999.
33. Masopust J, Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. díl. Karolinum, Praha 1998; 365-393
34. Mottl R, Diabetes mellitus s vaskulárními komplikacemi. Interní medicína pro praxi 2001;12:559-561
35. Olšovský J, Možnosti ovlivnění inzulinové rezistence. Farmakoterapie 2007;1:29-33: [www.farmakoterapie.cz](http://www.farmakoterapie.cz)
36. Pelikánová T, Inzulinová rezistence a metabolický syndrom. Interní medicína pro praktické lékaře 2004;1:43-48
37. Perušičová J, Škrha J, Piťhová P, Současný pohled na hodnocení kompenzace Diabetes mellitus. DMEV 2008;1:19-30
38. Perušičová J, Šmahelová A, Chronické komplikace diabetes mellitus. Interní medicína pro praxi 2001;1:34-38: [www.internimedicina.cz](http://www.internimedicina.cz)
39. Piťhová P, Akutní komplikace diabetes mellitus. Interní medicína 2006;12:523-525: [www.internimedicina.cz](http://www.internimedicina.cz)
40. Piťhová P, Inkretinové hormony a úloha inkretin-mimetik v léčbě diabetes mellitus 2. typu. Remedia 2006;2:174 -177: [www.remédia.cz](http://www.remédia.cz)
41. Paulev PE, Dr.Med.Sci, Textbook in Medical Physiology and pathophysiology, Section VII: Endocrine Glands in Humans, Chapter 27: Blood glucose and diabetes. 1999-2000
42. Poulsen PL, Hansen B, Amby T, Terkelsen T, Mogensen CE, Evaluation of dipstick test for microalbuminuria in three different clinical settings including the correlation with urinary albumin excretion rate. Diabetes Metab 1992;18:395-400
43. Průša R, Čepová J, Petrátková K, Příručka laboratorních vyšetření. Triton, Praha 2002;22

44. Racek Jaroslav et al, Klinická biochemie. Galén, Praha 2006;29:163 – 171
45. Raz I, Hanefeld M, Xu L, et al, Efficacy and safety of the dipeptidyl-peptidase 4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetologia 2006; 49:2564–71
46. Reinauer H, Home PD, Kanabasaagapathy AS, Heuck C-Ch, Laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. World Health Organization 2002
47. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE, Defining the relationship between plasma glucose and HbA<sub>1c</sub>. Diabetes Care 2002;25:275-278
48. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK et al, Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clinical Chemistry 2002; 48: 436-472
49. Stahl M, Joergensen GM, Hyltoft Petersen P, Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61:169 -180
50. Svačina Š, Owen K, Syndrom inzulinové rezistence. Triton, Praha 2003; 182
51. Szabó M, Význam markerů autoimunní inzulitidy pro klasifikaci, predikaci a prevenci diabetes mellitus. DMEV 2004;2:77-82
52. Šálek T, Laboratorní diagnostika diabetes mellitus a diabetické neuropatie. Medicína pro praxi 2007; 4(9): 369-370: [www.medicinapropraxi.cz](http://www.medicinapropraxi.cz)
53. Timsit J, Bellanné-Chantelot Ch, Dubois-Laforgue D, Velho G, Diagnosis and management of Maturity-Onset Diabetes of the Young. Treat Endocrinol 2005;4(1):9-18
54. Ústav klinické imunologie a alergologie FN HK, Laboratorní vyšetření v klinické imunologii. Garamon, Hradec Králové 2004;50-51
55. Valenta CL, Urine testing and home blood-glucose monitoring. Nurs Clin North Am 1983;18:645-659
56. Vavřinec J, Šnajderová M, Koloušková S, Šumník Z, Cinek O, Autoimunní inzulitis a diabetes mellitus I. typu. Postgraduální medicína 2000; 2: 27-31.
57. Vondra K, Hampl R, Stárka L, Glykoregulace a glukózová tolerance při léčbě glukokortikoidy. DMEV 2001; 4: 238-248
58. Wen S-F, Boynar JW Jr, Stoll RW, Mechanism of glycosuria during volume expansion superimposed on subthreshold glucose loading. J Lab Clin Med 1983; 101 : 708-716
59. oficiální stránky České diabetologické společnosti: [www.diab.cz](http://www.diab.cz)

60. oficiální stránky České společnosti klinické biochemie: <http://www.eskb.cz/>
61. oficiální stránky Institutu biostatistiky a analýz Lékařské a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity : <http://www.iba.muni.cz/>
62. oficiální stránky firmy Roche: [www.roche.cz](http://www.roche.cz)
63. oficiální stránky Svazu diabetiků České republiky: [www.diazivot.cz](http://www.diazivot.cz)
64. oficiální stránky společnosti Systém externí kontroly kvality: [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz)
65. oficiální stránky Ústavu zdravotnických informací a statistiky: <http://www.uzis.cz>
66. oficiální stránky Všeobecné zdravotní pojišťovny: <http://www.vzp.cz>